

TITEL DER ARBEIT

INHIBITOREN AUS DEM BLUTEGEL HIRUDO MEDICINALIS
MIT HEMMWIRKUNG GEGEN CHYMOTRYPSIN, SUBTILISIN UND
DIE MENSCHLICHEN GRANULOZYTENPROTEINASEN ELASTASE
UND KATHEPSIN G

ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND STUDIEN
ZUM HEMMECHANISMUS

Ursula Seemüller

—
1900
—

Gaisser + Hirschmann
Studio für Offsetdruck

Fotosatz · Beratung · Reproduktion · Fotos · Design

Postach 306 · 7290 Freudenstadt · Telefon (07443) 3330





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0071

INHIBITOREN AUS DEM BLUTEGEL HIRUDO MEDICINALIS
MIT HEMMWIRKUNG GEGEN CHYMOTRYPSIN, SUBTILISIN UND
DIE MENSCHLICHEN GRANULOZYTENPROTEINASEN ELASTASE
UND KATHEPSIN G

ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND STUDIEN
ZUM HEMMECHANISMUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von
Ursula Seemüller

München

November 1979



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Severing

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1980

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof.Dr. Hans Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München durchgeführt.

Ich hatte das Glück, meine Doktorarbeit an einem Institut zu machen, das durch eine offene, persönliche Atmosphäre geprägt ist, so daß mir meine Arbeit nur selten verdrießlich war. Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und ihr Interesse; insbesondere danke ich Frau Perlich für die stets zuverlässige Durchführung der Aminosäureanalysen und Herrn Werner Müller-Esterl für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung.

Herrn Dr. Eulitz vom Institut für Immunologie und Klinische Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, danke ich für die Durchführung der Sequenzarbeiten.

Eingearbeitet in die "praktische Biochemie" der Proteinase-Inhibitoren wurde ich von Frau Maria Meier, die mich auch über den gesamten Zeitraum meiner Doktorarbeit im gemeinsamen Labor ertragen mußte. Sie hat mich nicht nur bei der Isolierung der Eglyne unterstützt, sondern auch durch ihr Interesse und Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Doktorvater Hans Fritz danke ich für seine vielseitige, ideenreiche Unterstützung. Sein Idealismus und seine Begeisterung an der Forschung haben meine Einstellung und meine Arbeit maßgeblich beeinflusst. Die positive Motivation, die ich aus den Diskussionen mit ihm heraustragen konnte, haben mich besonders in den ergebnislosen Durststrecken zu neuen Experimenten inspiriert.

Letztendlich, in die vorliegende Form gebracht wurde diese Arbeit durch das emsige Tippen von Maria und die gelungene graphische Darstellung der Tabellen und Abbildungen von meinem Bruder Wolfgang.

Verzeichnis der Abkürzungen

Ala - Alanin	Gly - Glycin
Arg - Arginin	Ile - Isoleucin
Asn - Asparagin	Leu - Leucin
Asp - Asparaginsäure	Lys - Lysin
Asx - Asn oder Asp	Pro - Prolin
Cys - Cystein	Ser - Serin
Gln - Glutamin	Thr - Threonin
Glu - Glutaminsäure	Tyr - Tyrosin
Glx - Gln oder Glu	Val - Valin

ATE	Antithrombin-Einheiten
ADH	Alkoholdehydrogenase
Ac	Acetat
BBi	Bowman-Birk-Inhibitor
BNPS	2-(2 -Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromindolenin
BPTI	basischer Pankreas-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen (Trasylo ^R)
BTEE	N ^α -Benzoyl-Tyrosin-äthylester
BzArgNHNP	N ^α -Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid
BzArgOEt	N ^α -Benzoyl-L-arginin-äthylester
BzPheValArgNHNP	N ^α -Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginin-p-nitroanilid
BzTyrOEt	N ^α -Benzoyl-L-tyrosin-äthylester
CPI	chick peas inhibitor
CUSI	cervix uteri secretory inhibitor
Dc	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DSI	dog submandibularis inhibitor

Gc	Gaschromatographie
HPTLC	high pressure thin layer chromatography
HUSI	Human-Seminalplasma-Inhibitor
IU bzw. mIU	Inhibitor-Unit bzw. milli-Inhibitor-Unit
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit
PSTI	sekretorischer Pankreas-Trypsin-Inhibitor
PTH	Phenylthiohydantoin
Rh	Rückhydrolyse
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Sulfopropyl-
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Suc(Ala) ₃ NHNP	N ^α Succinyl-(alanyl) ₃ -p-nitroanilid
SucPheNHNP (SUPHEPA)	N ^α -Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid
TLCK	N-Tosyl-L-Lysin-chloromethylketon
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon
TRA	Triäthanolamin
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	4
B.1. Allgemeine Charakterisierung von Protein-Proteinase-Inhibitoren	4
B.2. Blutegel-Inhibitoren	21
B.3. Aufgabenstellung	25
C ERGEBNISSE	26
C.1. Isolierung der Eglyne	26
C.1.1. Gelfiltration an Sephadex G-75	26
C.1.2. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	28
C.1.3. Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex	31
C.1.4. Entsalzung	31
C.1.5. Bemerkungen zur Isolierung	31

C.2.	Reinheitsprüfungen und Charakterisierung von Eglin b und Eglin c	31
C.2.1.	Elektrophoresen	36
C.2.1.1.	Disk-Elektrophorese	36
C.2.1.2.	SDS-Elektrophorese	36
C.2.1.3.	Isoelektrische Fokussierung	36
C.2.2.	Endgruppenbestimmung	38
C.2.2.1.	N-terminale Aminosäure	38
C.2.2.2.	C-terminale Aminosäure	38
C.2.3.	Aminosäurezusammensetzung	41
C.2.4.	Reduktion und Carboxymethylierung	43
C.2.5.	Stabilität	43
C.2.6.	Hemmcharakteristik	45
C.3.	Bestimmung der Sequenz von Eglin c	49
C.3.1.	Automatischer Edmanabbau des nativen Eglins	51
C.3.2.	Tryptische Spaltung	54
C.3.2.1.	Isolierung der tryptischen Peptide	55
C.3.2.1.1.	Gelchromatographie an Biogel P30	55
C.3.2.1.2.	Rechromatographie an Biogel P6	57
C.3.2.1.3.	Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex	57
C.3.2.1.4.	Rechromatographie an Biogel P2	61
C.3.2.2.	Bemerkungen zur Isolierung der tryptischen Peptide	61
C.3.2.3.	C-terminale Sequenz von Peptid T8	61

		Seite
C.3.2.4.	Sequenz der tryptischen Peptide	64
C.3.2.5.	Bemerkungen zur Sequenz	68
C.4.	Untersuchungen zum Hemmechanismus	70
C.4.1.	Inkubation von Eglin c mit Trypsin	70
C.4.2.	Inkubation von Eglin c mit Chymotrypsin	71
D	MATERIAL UND METHODEN	75
D.1.	Apparate	75
D.2.	Substanzen	76
D.2.1.	Enzyme	76
D.2.2.	Substrate	77
D.2.3.	Materialien für die Säulenchromatographie	77
D.2.4.	Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	78
D.2.5.	Materialien für die Sequenzierung	78
D.2.6.	Andere Materialien	78

D.3.	Methoden	79
D.3.1.	Enzym- und Hemmtests	79
D.3.2.	Isolierung der Eglyne	81
D.3.2.1.	Gelchromatographie an Sephadex G-75	81
D.3.2.2.	Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	81
D.3.2.3.	Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex	82
D.3.3.	Reinheitsprüfungen und Charakterisierung der Eglyne	82
D.3.3.1.	Elektrophoresen	82
D.3.3.1.1.	Disk-Elektrophorese	82
D.3.3.1.2.	SDS-Elektrophorese	83
D.3.3.1.3.	Isoelektrische Fokussierung	83
D.3.3.2.	Aminosäureanalysen	83
D.3.3.3.	Reduktion und Carboxymethylierung	84
D.3.3.4.	Endgruppenbestimmungen	84
D.3.3.5.	Hemmkurven und Inhibitor konstanten	85
D.3.3.6.	Proteinbestimmung	85
D.3.4.	Sequenzbestimmung	85
D.3.4.1.	Dünnschichtchromatographische Peptiddetektion	85
D.3.4.2.	Citraconylierung	86
D.3.4.3.	Tryptische Spaltung	86
D.3.4.4.	Isolierung der tryptischen Peptide	87
D.3.4.4.1.	Gelchromatographie an Biogel P30	87
D.3.4.4.2.	Gelchromatographie an Biogel P60	87
D.3.4.4.3.	Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex	87
D.3.4.4.4.	Gelchromatographie an Biogel P2	87
D.3.4.5.	Sequenzuntersuchungen	88

E	DISKUSSION	89
E.1.	Zur Isolierung	89
E.2.	Zur Charakterisierung	90
E.3.	Zur Sequenzaufklärung	93
E.4.	Zum Hemmechanismus	94
E.5.	Hemmcharakteristik und Homologie	102
E.6.	Die Zielenzyme der Egline, die menschlichen PMN-Granulozytenenzyme	107
E.7.	Pharmakologische Untersuchungen	108
F	AUSBLICK	
	ERGÄNZUNG	113
	LITERATURVERZEICHNIS	114
	LEBENS LAUF	124

ZUSAMMENFASSUNG

1) Isolierung der Eglins

Aus einem Blutegelrohextrakt wurden zwei Isoinhibitoren in reiner Form isoliert, die als Eglin b und Eglin c bezeichnet wurden.

2) Hemmcharakteristik

Das Hemmspektrum der Eglins umfaßt von den bekannteren Proteinasen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Die Eglins bilden mit diesen Enzymen Komplexe in äquimolarem Verhältnis. Die graphische Ermittlung der Dissoziationskonstanten dieser Eglin-Proteinase-Komplexe ergab Werte in der Größenordnung von 10^{-10} Mol/l.

Dagegen hemmen die Eglins Trypsin und Pankreas-Elastase nur schwach.

3) Chemische Charakterisierung

Eglin b und Eglin c sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 073 bzw. 8 099, bestehend aus 70 Aminosäuren. Die beiden Isoinhibitoren unterscheiden sich voneinander in ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihrem isoelektrischen Punkt, was wahrscheinlich auf den Austausch einer Aminosäure (His -- Tyr) und einem unterschiedlichen Amidierungsgrad beruht.

Als interessantestes Ergebnis der Aminosäurezusammensetzung stellte sich heraus, daß die Eglins weder Cystin noch Cystein enthalten.

Dieses Resultat ist insofern überraschend, als die meisten bekannten, natürlich vorkommenden Serinproteinase-Inhibitoren (ausgenommen die Plasma-Inhibitoren) einen relativ hohen Gehalt an Cystin

besitzen. Dieses Strukturmerkmal ist hauptsächlich für die Stabilität dieser Proteinklasse verantwortlich und wird in Zusammenhang mit der biochemischen Wirkung der Inhibitoren, ihrer Interaktion mit Proteinasen, diskutiert.

4) Sequenz von Eglin c

Es wurde die Primärstruktur von Eglin c aufgeklärt:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NH ₂ -Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly-
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lys	Thr	Val	Asn	Gln	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	His	Tyr	Pro-
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Gln	Tyr	Asn	Val	Tyr	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Val	Thr	Leu-
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Asp	Leu	Arg	Tyr	Asn	Arg	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Asn	Pro	Gly	Thr-
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70					
Asn	Val	Val	Asn	His	Val	Pro	His	Val	Gly	COOH				

(s.Ergänzung S.113)

5) Hemmechanismus

Zur Charakterisierung des Hemmechanismus der Egline wurden Modifizierungsversuche mit Chymotrypsin durchgeführt. Das Ergebnis führte zu folgender Hypothese: Die Interaktion der Egline mit Chymotrypsin verläuft über eine limitierte Proteolyse unter Abspaltung eines Peptids aus dem Inhibitormolekül, wobei ein Acylenzymkomplex gebildet wird. In diesem stabilen Komplex sind die katalytischen Funktionen des Chymotrypsins gehemmt. Findet eine Dissoziation dieses Komplexes statt, wird aktives Chymotrypsin und ein inaktives Eglinfragment freigesetzt.

Der Hemmechanismus weist somit große Ähnlichkeiten mit dem der Plasma-Inhibitoren C $\bar{I}$ -Inaktivator und α_1 -Antitrypsin auf.

6) Homologie

Sequenzvergleiche mit anderen Inhibitoren zeigten bislang nur Homologie zum Chymotrypsin-Trypsin-Inhibitor I aus der Kartoffel.

Eine geringe Ähnlichkeit scheint auch zu Peptidfragmenten des α_1 -Antitrypsins vorzuliegen.

B. E I N L E I T U N G

B.1 Allgemeine Charakterisierung der Protein-Proteinase-Inhibitoren

Vorkommen

Neuere Erkenntnisse über die Bedeutung von Protein-Proteinase-Inhibitoren für essentielle biologische Funktionen des Organismus, z.B. bei der Blutgerinnung und Fortpflanzung, sowie die erfolgreiche therapeutische Verwendung einiger Inhibitoren in der Medizin und die besondere Eignung der Inhibitoren (infolge ihrer molekularen Eigenschaften) für Studien von Protein-Protein-Wechselwirkungen haben zu intensiver Forschung auf diesem Gebiet motiviert. Methodische Fortschritte sowohl bei der Isolierung als auch bei der Charakterisierung von Proteinen haben zu einer Vielzahl von erfolgreichen Arbeiten über Inhibitoren beigetragen (1-6).

Protein-Proteinase-Inhibitoren hat man in allen bisher untersuchten Organismen der belebten Natur gefunden, unabhängig von deren phylogenetischen Entwicklungsstufe. So wurden Inhibitoren isoliert aus der Hefezelle (7), aus Mikroorganismen (8-10), Pflanzen (1-3,6,11), niederen Tieren wie z.B. der Seeanemone (12), der Schnecke (13), dem Eingeweidewurm *Ascaris* (14), dem Blutegel (15-17), den Eiern vieler Vogelarten (18,19) und aus den verschiedensten Geweben, Drüsen und Sekreten von Säugetieren und des Menschen (1-6).

Definition

Protein-Proteinase-Inhibitoren sind Proteine oder Glykoproteine, die mit einer oder mehreren Proteinasen im stöchiometrischen Verhältnis in reversibler Weise Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen der Enzyme (kompetitiv) gehemmt sind (20).

Diese Definition trifft nicht für die hochmolekularen Plasma-Inhibitoren (z.B. α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin, Antithrombin III, C $\bar{1}$ -Inaktivator) zu, da diese auch irreversible Komplexe zu bilden vermögen.

Die Definition umfasst dagegen die niedermolekularen, mikrobiellen Inhibitoren von Peptid- bzw. Peptidaldehydstruktur mit Molekulargewichten unter 1 000 (z.B. Leupeptin, Chymostatin, Elastatinal, Pepstatin) und die meisten Inhibitoren pflanzlichen und tierischen Ursprungs, die eine Protein- bzw. Glykoproteinstruktur mit Molekulargewichten um 4 000 bis 50 000 aufweisen.

Hemmverhalten und Hemmspezifität

Eine Beurteilung der Inhibitoren nach ihrem Hemmverhalten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in Gegenwart des Enzyms erlaubt eine Unterteilung in drei Hemmtypen.

1. Permanente Hemmung:

Das Hemmgleichgewicht stellt sich schnell, d.h. innerhalb von Sekunden bis einigen Minuten ein und bleibt über Tage konstant. Als Beispiel dafür sei der basische Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (BPTI) genannt.

2. Temporäre Hemmung:

Die Hemmwirkung nimmt mit längerer Inkubationsdauer ab, d.h. der Inhibitor wird durch das inhibierte Enzym proteolytisch abgebaut (21,22). Als Beispiel dafür sei der sekretorische

Trypsin-Inhibitor aus Pankreas (PSTI) genannt.

3. Progressive Hemmung:

Das Hemmgleichgewicht wird erst nach längerer Inkubationszeit (>10 Minuten bis einigen Stunden) erreicht. Als Beispiel dafür seien die plasmatischen Inhibitoren genannt, wie α_1 -Antitrypsin gegenüber Kallikrein und Plasmin, Antithrombin III gegenüber Thrombin (23,24).

Weiterhin unterscheidet man zwischen Inhibitoren mit enger Spezifität, die nur sehr eng verwandte Proteinasen hemmen (z.B. PSTI), und den breitspezifischen oder polyvalenten Inhibitoren, die mehrere verschiedene Proteinasen hemmen (z.B. BPTI). Die Spezifität der polyvalenten Inhibitoren beschränkt sich allerdings auf eine Enzymklasse.

Die Proteinasen können in vier Klassen eingeteilt werden: die Serinproteinasen, Sulfhydrylproteinasen, saure Proteinasen und die Metalloproteinasen. Eine entsprechende Einteilung trifft für die Inhibitoren zu (Serinproteinase-Inhibitoren, Sulfhydrylproteinase-Inhibitoren, usw.). Eine Ausnahme bilden die Plasma-Inhibitoren, so hemmt z.B. α_2 -Makroglobulin Proteinasen der verschiedenen Enzymklassen.

Die weitaus größte Zahl der bisher untersuchten Inhibitoren sind gegen die Serinproteinasen gerichtet. Es sind aber auch Inhibitoren von Proteinasen der anderen Enzymklassen bekannt. So sind Inhibitoren beschrieben von der Schnecke gegen eine Sulfhydrylproteinase (25), von der Kartoffel gegen Carboxypeptidase A und und Pepsin (26,27) und von der Hefezelle gegen Carboxypeptidase Y (28).

Alle weiteren Ausführungen (ausgenommen die über die physiologische Funktion) beziehen sich auf die Inhibitoren der Serinproteinasen.

Physiologische Funktion

Die physiologische Funktion der Inhibitoren besteht im allgemeinen darin, "proteolytische Vorgänge zeitlich und räumlich zu begrenzen. Sie ergänzen so die übrigen Möglichkeiten des Organismus zur Steuerung der Wirkung proteolytischer Enzyme" (1).

Als eine solche zeitliche Begrenzung ist z.B. die Sistierung der proteolytischen Vorgänge im Ruhestadium der Samen (29) zu betrachten oder allgemein ausgedrückt, " die Aufrechterhaltung der latenten Lebensform durch Hemmung der Autolyse" (30). Andere biochemische Prozesse, an denen Enzym-Inhibitor-Regelmechanismen beteiligt sind, sind z.B. die Blutgerinnung (31) und Fibrinolyse (32), immunbiologische Vorgänge (33), Entzündungsreaktionen (34), Befruchtungsvorgänge (35,36), die Freisetzung von biologisch aktiven Peptiden aus Precursor-Molekülen (37) und die Verhinderung einer vorzeitigen Proenzymaktivierung (s.Tab.1).

Die Bedeutung der speziellen physiologischen Funktion der einzelnen Inhibitoren setzt die Kenntnis der natürlichen Zielenzyme und der genauen Lokalisation von Inhibitor und Zielenzym - und somit der Möglichkeit ihres Zusammenspiels - voraus.

Die Regulation proteolytischer Prozesse durch Inhibitoren sei an einigen Beispielen dargestellt:

Die Inhibitoren der Parasiten, insbesondere der Eingeweideparasiten, schützen diese vor der Verdauung durch die Wirtsenzyme. Für diese Inhibitoren werden auch Transportfunktionen diskutiert (14).

Der sekretorische Pankreas-Trypsin-Inhibitor schützt den Pankreas vor der Eigenverdauung bei vorzeitiger Zymogenaktivierung (38,39).

Die Inhibitoren in den Schleimsekreten von Nase, Augen, Cervix und Bronchien schützen andere Sekretproteine und die Epithelzellen vor dem Angriff leukozytärer Proteinasen, die im Verlauf einer bakteriellen Entzündung lokal freigesetzt werden (33).

Das ineinandergreifende Zusammenspiel von Enzymen und korrespondierenden Inhibitoren wurde detailliert für die Hefezelle dargestellt (40).

Tabelle 1 Beispiele für biochemische Prozesse, die unter Mitbeteiligung von Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren gesteuert werden (s.a.169)

physiologischer Prozess	beteiligte Proteinase	Inhibitor	biochemischer Vorgang
Blutgerinnung	Faktor Xa Faktor IIa	Antithrombin III/ Heparin	Prothrombin --> Thrombin Fibrinogen --> Fibrin
	Faktor XIIa	C $\bar{1}$ -Inaktivator	
Fibrinolyse	Plasmin	α_2 -Antiplasmin α_2 -Makroglobulin	Fibrin--> lösliche Spalt- produkte
immunologische Vorgänge	C $\bar{1}$, (C $\bar{1}$ s, C $\bar{1}$ r) Faktor XIIa (Hageman-Faktor)	C $\bar{1}$ -Inaktivator	Aktivierung der Immunabwehr (Komplementsystem)
Entzündungsreaktionen	Granulozytenproteinasen (Elastase, Katherpsin G)	α_1 -Antitrypsin α_2 -Makroglobulin H $\bar{O}$ SI-I (C $\bar{U}$ SI)	Abwehrmechanismus bei Infektionen, (Abbau von Bakterienprotein, Immunkomplexen usw.)
Befruchtung	Akrosin	H $\bar{U}$ SI-II	Penetration der Eihülle u.a.
Freisetzung von biologisch aktiven Peptiden aus Precursor-Molekülen	Plasma-Kallikrein	C $\bar{1}$ -Inaktivator α_2 -Makroglobulin α_1 -Antitrypsin	Kininogen --> Kinin Aktivierung der Gerinnung und Fibrinolyse
			Proinsulin --> Insulin
Prooenzymaktivierung	Trypsin	sekretorischer Pankreas-Trypsin-inhibitor (PSTI)	Prooenzymaktivierung der Pankreas-Proteinasen, z.B. Trypsinogen --> Trypsin
	Plasminogenaktivator		Plasminogen --> Plasmin

Molekulare Aspekte

Dieser einleitende Abschnitt wird deswegen näher ausgeführt, weil er die Voraussetzung und Motivation für einige Untersuchungen dieser Arbeit darstellt und das Verständnis für die Interpretation der Ergebnisse dieser Untersuchungen erleichtert.

Im Folgenden sollen zwei molekulare Aspekte der Inhibitoren näher beschrieben werden:

1. die Struktur, soweit sie für Protein-Proteinase-Inhibitoren charakteristisch ist und
2. das reaktive Zentrum, d.h. der Teil des Inhibitors, der mit dem aktiven Zentrum des Enzyms direkt in Kontakt tritt.

Die Bezeichnung der Aminosäurereste (P_i) im reaktiven Zentrum erfolgt nach Schechter und Berger (41): $\text{NH}_2\text{-P}_x\text{...P}_2\text{-P}_1\text{-P}'_1\text{-P}'_2\text{...P}'_x\text{-COOH}$, wobei $P_1\text{-P}'_1$ die Peptidbindung des reaktiven Zentrums darstellt.

Struktur

Proteinase-Inhibitoren zeichnen sich häufig durch eine relativ große Stabilität gegen chemische und thermische Denaturierung, sowie proteolytischen Abbau aus (20). Diese für Proteine außergewöhnliche Stabilität führt man auf den hohen Gehalt an Cystin (9-15% Cys/2) zurück, der den meisten Inhibitoren gemeinsam ist. Kein Cystein bzw. Cystin enthält der Proteinase B-Inhibitor aus der Hefezelle (42,43) und die Egline, die Gegenstand dieser Arbeit sind. Ausnahmen sind ebenfalls die Serum-Inhibitoren, wie z.B. das α_1 -Antitrypsin, das bei einem Molekulargewicht von 54 000 nur eine Sulfhydrylgruppe enthält.

Die kovalente Verknüpfung durch Disulfidbrücken führt zu einer räumlichen Fixierung der dreidimensionalen Struktur des Inhibitors. Untersuchungen über das reaktive Zentrum legten die Hypothese nahe, daß eine der Disulfidbrücken dieses wie eine Klammer (disulfide loop) umschließt (20,44) und dadurch zur Sta-

bilität, zur räumlichen Fixierung ("Starre") besonders dieses Sequenzteils beiträgt.

Die Aufklärung der Raumstruktur für den BPTI (45) (s.Abb.1) und den Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI) (46) mittels Röntgenstrukturanalyse bietet eine Bestätigung für diese Annahme.

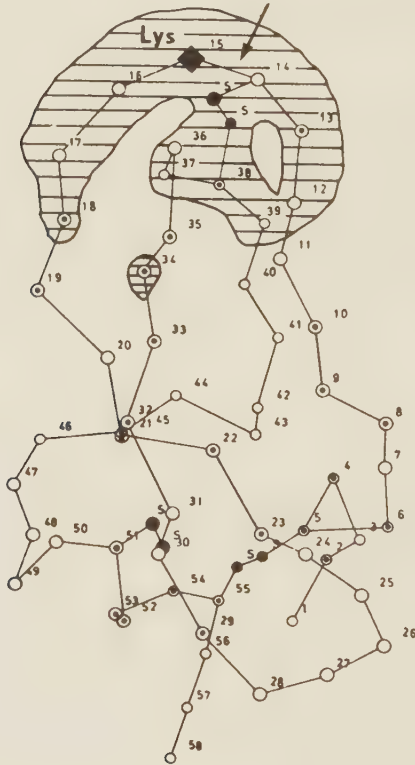


Abb.1 Projektion des Raumstrukturmodells vom basischen Pankreas-Trypsin-Inhibitor

Lys15-Ala16 reaktives Zentrum

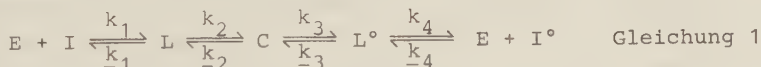


Disulfidbrücken

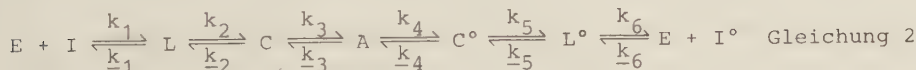
Die Aminosäure P_1 im reaktiven Zentrum bestimmt normalerweise die Hemmspezifität des Inhibitors, die üblicherweise mit der Substratspezifität des gehemmten Enzyms übereinstimmt. So findet man in dieser Position bei Trypsin-Inhibitoren Arginin oder Lysin, bei Chymotrypsin-Inhibitoren Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan oder Leucin und bei Elastase-Inhibitoren Leucin oder Valin. Die Seitenketten dieser Aminosäuren werden bei der Hemmreaktion substratanalog in die Spezifitätstasche des Enzyms eingelagert.

Reaktives Zentrum

Studien über den Mechanismus der Enzym-Inhibitor-Reaktion führten zu der Hypothese, daß Protein-Proteinase-Inhibitoren einen für das betreffende Enzym besonders affinen Strukturbereich mit einer spezifischen, labilen Peptidbindung enthalten - das reaktive Zentrum - die in der Interaktion mit dem hemmbaren Enzym (d.h. bei der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes) spezifisch von diesem gespalten werden kann (20). Laskowski und Sealock formulierten ursprünglich folgenden Minimalmechanismus:



der später von Laskowski und Mitarbeitern (47) und Quast und Mitarbeitern (48) ergänzt wurde:



Dabei bedeutet: E - Enzym, I - Inhibitor, I° - modifizierter Inhibitor (Peptidbindung P_1-P_1' im reaktiven Zentrum hydrolysiert), L - Komplexvorstufe aus E + I, L° - Komplexvorstufe aus E + I° , C - Komplex aus E + I, C° - Komplex aus E + I° , A - Acylenzymkomplex (kovalenter Komplex).

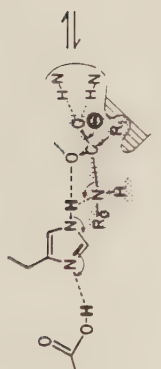
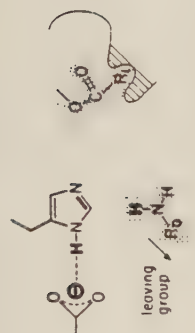
Die Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor verläuft analog der Enzym-Substrat-Reaktion mit dem Unterschied, daß der Enzym-Inhibitor-Komplex sehr viel stabiler ist als der entsprechende Enzym-Substrat-Komplex. Letzterer reagiert unter Energiegewinn nach Substrathydrolyse weiter zum Acylenzym (Abb.2). Das Gleichgewicht der Enzym-Substrat-Reaktion liegt auf der Seite der hydrolytischen Spaltprodukte, sofern man im pH-Optimum des Enzyms arbeitet.

Im Gegensatz dazu tritt bei der Enzym-Inhibitor-Reaktion der Enzym-Inhibitor-Komplex, das sogenannte tetraedrische Zwischenprodukt, als die zentrale Komponente auf. Dieser Komplex stellt ein sehr stabiles, energetisch begünstigtes Produkt dar, was nur in geringem Maße zum Acylenzym weiterreagiert. Die mit dieser Reaktion verbundene Hydrolyse der Peptidbindung $P_1-P'_1$ im reaktiven Zentrum des Inhibitors führt zur Bildung des modifizierten Inhibitors. Der modifizierte Inhibitor ist ebenfalls voll aktiv, die Komplexbildung mit dem Enzym erfolgt aber im Gegensatz zum nativen Inhibitor sehr viel langsamer.

Da im thermodynamischen Gleichgewicht nur ein Teil der Bindungen $P_1-P'_1$ hydrolytisch gespalten wird, spricht man auch von Partialhydrolyse, die quantitativ mit der Hydrolysekonstante (K_{hyd}) erfasst wird.

$$K_{hyd} = (I^o)/(I) \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Hydrolysekonstante ist stark pH-abhängig; für die Serinproteinasen findet man Minimalwerte im pH-Optimum dieser Enzyme (neutrales bis schwach alkalisches Medium) und Maximalwerte bei pH 3-4. In Abbildung 3 ist die pH-Abhängigkeit für das System STI/Trypsin aufgezeigt. Die Peptidspaltung im reaktiven Zentrum der Inhibitoren "verläuft damit als spezielle Substrathydrolyse bei sehr unphysiologischem pH-Wert, bei dem Proteine normalerweise nicht gespalten werden" (5).

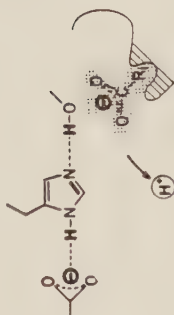
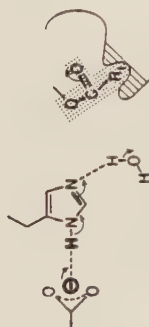


Spezifitäts-tasche
des Enzyms

Enzym - Substrat - Assoziat (L)

Tetraedrisches Zwischenprodukt (C)

Acylenzym - Komplex (A)



Acylenzym - Komplex (A)

Tetraedrisches Zwischenprodukt (C)

Enzym - Produkt - Assoziat (L')

Abb. 2

Mechanismus der Substrathydrolyse der Serinproteinasen (in Anlehnung an 170)

R₀ C-terminaler Peptidteil (= -P₁' -P₁' -COOH)

R₁ enzimspezifischer Aminosäurerest mit N-terminalem Peptidteil (= H₂N-P_x-P₁-)

Substratmolekülteile

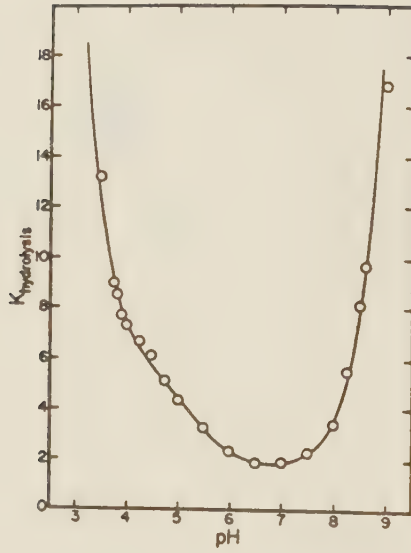


Abb.3 pH-Abhängigkeit der Hydrolysekonstante
des Systems STI/Trypsin (168)

Protein-Proteinase-Inhibitoren sind hervorragende Substrate bezüglich ihrer Anpassung an das Enzym. Ihre Hemmwirkung beruht auf einer sehr geringen und sehr langsamen Dissoziation der Enzym-Inhibitor-Komplexe bei neutralem pH.

Die limitierte Proteolyse

Man bezeichnet die spezifische Spaltung der P_1 - P_1' -Peptidbindung im reaktiven Zentrum der Inhibitoren auch als limitierte Proteolyse. Die Bestätigung der limitierten Proteolyse wurde durch folgende Nachweise erbracht:

1. die Identifizierung des modifizierten Inhibitors,
2. enzymatische Modifikationen am reaktiven Zentrum und
3. die kinetisch kontrollierte Resynthese der Peptidbindung P_1 - P_1' im modifizierten Inhibitor.

Zu 1.

Der modifizierte Inhibitor enthält eine zusätzliche C-terminale Aminosäure aus der hydrolysierten Peptidbindung P_1 - P_1' des reaktiven Zentrums. Diese P_1 -Aminosäure ist normalerweise mit Carboxypeptidase quantitativ abspaltbar; es entsteht dadurch ein inhibitorisch inaktives Produkt.

Zu 2.

Der Austausch der P_1 -Aminosäure (s. Reaktionsfolge in Abb.4) gegen eine Aminosäure ähnlicher Spezifität (z.B. Lysin gegen Arginin) rekonstituiert die ursprüngliche Hemmaktivität, beim Austausch gegen eine Aminosäure anderer Spezifität (z.B. Lysin gegen Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin) resultiert eine Veränderung der Hemmspezifität entsprechend der Substratspezifität des beteiligten Enzyms ("enzymatische Mutation", s.Abb.4).

Der Nachweis der limitierten Proteolyse wurde u.a. für den Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (44), den Limabohnen-Trypsin-Inhibitor

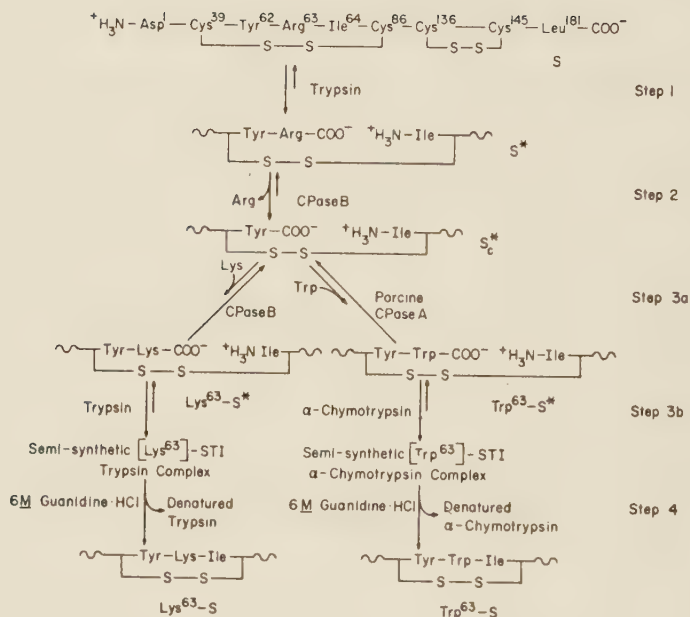


Abb.4 Enzymatische Modifikation des reaktiven Zentrums
in Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (55)

S ⁺	nativer STI (mit Arginin im reaktiven Zentrum)
S ⁺ _C	modifizierter STI (Peptidbindung des reaktiven Zentrums gespalten)
Lys ⁶³ -S ⁺	modifizierter STI (hemminaktiv) mit abgespaltenem Argininrest (63) im reaktiven Zentrum
Lys-S	mutierter STI mit Lysin im reaktiven Zentrum (Hemmaktivität gegen Trypsin)
Trp ⁶³ -S ⁺	modifizierter STI mit Tryptophan im reaktiven Zentrum
Trp ⁶³ -S	mutierter STI mit Tryptophan im reaktiven Zentrum (Hemmaktivität gegen Chymotrypsin)

(49) und den sekretorischen Pankreas-Trypsin-Inhibitor (50,51) erbracht.

Von dem äußerst stabilen BPTI nahm man lange Zeit an, gestützt auf experimentelle Befunde, daß er keiner limitierten Proteolyse bei der Interaktion mit den von ihm gehemmten Enzymen unterliegt. Diese Meinung mußte nach Untersuchungen von Jering und Tschesche dahingehend korrigiert werden, daß nach vorangehender Modifizierung des BPTI auch dieser Inhibitor einer limitierten Proteolyse unterliegt (52).

Der BPTI konnte nach selektiver Reduktion der Cys14—Cys34 Disulfidbrücke, anschließender Inkubation mit Trypsin und Reoxydation der Disulfidbrücke in seine modifizierte Form übergeführt werden (Abb.5).

Tschesche und Mitarbeiter konnten ferner durch Langzeitinkubationsversuche beweisen, daß auch der native BPTI einer limitierten Proteolyse unterliegt und sich ein echtes thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem nativen und dem modifizierten Inhibitor ausbildet (53).

Enzymatische Austauschreaktionen am aktiven Zentrum wurden mit dem STI (54,55) und dem BPTI (56) durchgeführt.

Zu 3.

Aus den Reaktionsgleichungen 1 und 2 geht hervor, daß die aus nativem und modifiziertem Inhibitor gebildeten tetraedrischen Zwischenprodukte identisch sind. Inkubiert man modifizierten Inhibitor mit einem Enzym im neutralen pH-Bereich, so stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen modifiziertem und nativem Inhibitor ein. Unterwirft man diese Lösung Bedingungen, die eine rasche Dissoziation des E-I-Komplexes erzwingen (pH 2 oder 6M Guanidin/HCl), so entsteht als überwiegendes Reaktionsprodukt nativer Inhibitor entsprechend dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten ($k_{-2} \gg k_3$) der Dissoziationsreaktionen.

Diese sog. kinetisch kontrollierte Dissoziation liefert den Be-

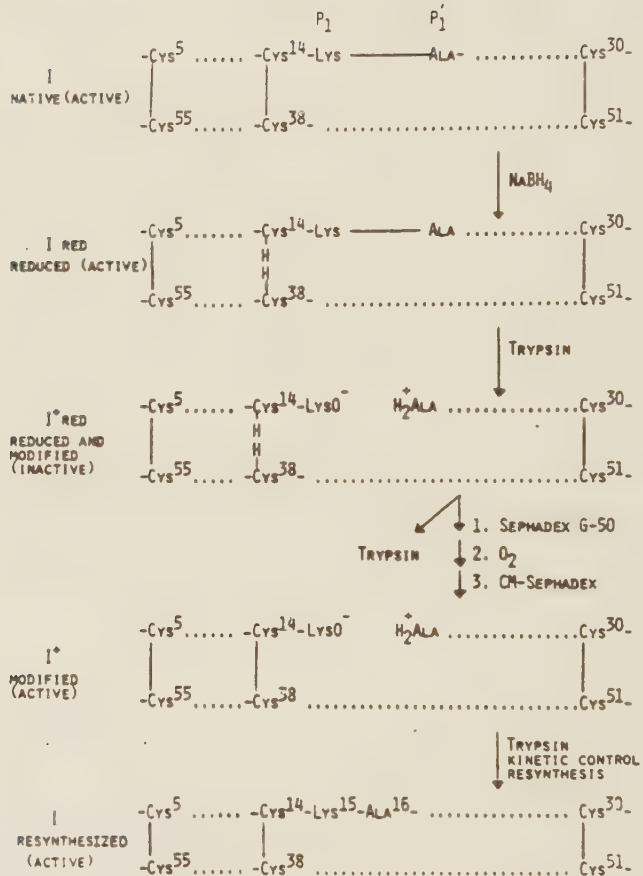


Abb.5 Darstellung des modifizierten basischen Pankreas-Trypsin-Inhibitors (52)

weis für die Gültigkeit des beschriebenen Enzym-Inhibitor-Reaktionsmodells und das Vorliegen einer spezifischen, reaktiven Peptidbindung. Sie wurde erfolgreich durchgeführt für die Komplexe aus STI mit Trypsin (54,57), BBI mit Trypsin bzw. Chymotrypsin (58) und BPTI mit Trypsin, Chymotrypsin sowie Plasmin (53).

Die Ergebnisse aus den enzymatischen Studien am reaktiven Zentrum konnten z.T. durch strukturphysikalische Untersuchungen bestätigt werden. Mittels Röntgenstrukturanalyse gelang die Aufklärung der stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexe vom BPTI (59) und STI (46) mit Trypsin. Diese und ergänzende Untersuchungen (60,61) ergaben, daß die Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor auf eine kleine Kontaktzone beschränkt ist, daß aber diese kontaktierenden Bereiche der beiden Proteine auf Grund der komplementären Strukturen zu einer optimalen Anpassung fähig sind (62,63).

Die Kontaktbereiche sowohl des Enzyms als auch des Inhibitors sind relativ starre Molekülteile, die meistens durch Disulfidbrücken fixiert sind (64) und sich ohne erhebliche Konformationsänderung zum Komplex vereinigen. Die stabilisierende Energie wird von einer begrenzten Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen (eingeschlossen die Bindungen zwischen der Seitenkette der P_1 -Aminosäure des Inhibitors und den Aminosäuren der Spezifitätstasche des Enzyms) sowie vielen van der Waal'schen Kontakten erbracht. Ein geringer Energieanteil resultiert aus der kovalenten Bindung zwischen der Carbonylgruppe der P_1 -Aminosäure des Inhibitors und der Hydroxylgruppe des katalytisch aktiven Serinrestes des Enzyms. Die Ausbildung dieser kovalenten Bindung zum tetraedrischen Addukt (tetrahedral intermediate) und weiter zum Acylenzym-Komplex kann erfolgen (limitierte Proteolyse, Partialhydrolyse), ist aber keine notwendige Voraussetzung für die Enzym-Inhibitor-Assoziation. Es sind stabile Komplexe mit katalytisch inaktiven Enzymen, z.B. mit Anhydrochymotrypsin und Anhydrotrypsin (65-67) und anderen Derivaten (68,69) bekannt. Die ideale Anpassung ("fit") der beiden komplementären Bereiche gibt

dann genügend Energie zur Bildung des Adduktes. Ähnliche sich ergänzende Raumstrukturen findet man auch bei Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Homologie

Obwohl die meisten der Serinproteinasen-Inhibitoren mit den Enzymen nach dem gleichen Mechanismus reagieren (s.S.11), weisen sie in ihren Sequenzen keine einheitliche Struktur auf. Man unterscheidet mehrere homologe Familien (Tab.2), von denen die Kunitz- und Kazal-Familie am längsten bekannt sind. Die fortschreitende Sequenzierung von neuen Inhibitoren hatte eine Erweiterung der Anzahl der homologen Familien zur Folge.

Nach einer Hypothese von Lakowski Jr. sind diese Familien analog und nicht homolog zueinander und eine konvergierende Entwicklung hat zu dem gleichen Wirkmechanismus mit den Serinproteinasen geführt (70).

Tabelle 2

Homologe Familien der Serinproteinasen-Inhibitoren
in Anlehnung an Laskowski Jr. (70)

- 1 Kunitz-BPTI-Typ
- 2 Kazal-Typ
- 3 Trypsin-Inhibitor vom Ascaris-Typ
- 4 Chymotrypsin-Inhibitor vom Ascaris-Typ
- 5 Bowman-Birk Leguminosen-Typ
- 6 Kunitz-STI-Typ
- 7 Kartoffel I-Typ
- 8 Kartoffel II-Typ
- 9 Andere Typen

B.2 Blutegelinhibitoren

Hirudin

Die blutgerinnungshemmende Wirkung des Blutegels *Hirudo medicinalis* und seine therapeutische Anwendung ist seit Jahrhunderten bekannt, das wirksame Prinzip wurde jedoch erst vor 20 Jahren von Markwardt und Mitarbeitern aufgeklärt. Er identifizierte die blutgerinnungshemmende Substanz als ein Protein, genannt Hirudin (71), das spezifisch Thrombin hemmt (72,73). Weitere Forschungen von Markwardt (15) und anderen Arbeitsgruppen (17) führten zu weiteren wesentlichen Erkenntnissen.

1976 gelang die Aufklärung der Primärstruktur (74) (Abb.6). Hirudin besteht aus 67 Aminosäuren; es fällt der hohe Gehalt der sauren Reste Glutamin- und Asparaginsäure auf, die für den niederen isoelektrischen Punkt von 3,8 - 4,0 (75) verantwortlich sind. Bemerkenswert ist der sulfonierte Tyrosinrest in Position 63, dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte.

Hirudin hemmt spezifisch Thrombin. Thrombin, Blutgerinnungsfaktor IIa, kommt als Prothrombin im Blut vor. Es katalysiert den letzten enzymatischen Schritt der Gerinnungskaskade, die nach der Quervernetzung der entstandenen Fibrinmonomere durch Faktor XIII mit der Bildung eines Blutgerinnsels abschließt. Der wichtigste natürlich vorkommende Inhibitor des Thrombins ist das Antithrombin III. Die Hemmaktivität des Antithrombin III tritt entsprechend einer Progressivhemmung erst mit zeitlicher Verzögerung ein. Diese Reaktionsverzögerung ist dadurch bedingt, daß Antithrombin III erst nach einer Konformationsänderung seine Hemmaktivität gegen Thrombin (und Faktor Xa) voll entfalten kann. Dieser konformationsändernde Vorgang wird durch Heparin (einem sauren Polysaccharid) um das 200 - 400fache beschleunigt. Heparin ist somit ein Kofaktor des Antithrombin III und nur in Verbindung mit diesem Inhibitor wirksam. Eine Störung des physiologischen Gleichge-

1
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-
10
20

23
Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-
30
40

45
Thr-Pro-Gly-Pro-Gln, (Ser, His, Asx, Asx, Asx, Gly) -Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu, Tyr-Leu-Gln
50
60
SO₃⁻

1
22
1

Abb. 6 Sequenz von Hirudin (74)

wichtiges zwischen Thrombin und seinen Seruminhibitoren führt zu Gerinnungsstörungen.

Hirudin wird auf Grund seiner Monospezifität gegen Thrombin für hämostasiologische Studien und als mögliches Pharmakon bei Hyperkoagulabilität diskutiert. Gegenüber Heparin, einem der gängigsten Antikoagulantien, hat Hirudin den Vorteil, auch bei niedrigem Antithrombin III-Spiegel (z.B. bei Verbrauchskoagulopathie mit folgendem septischem Schock, angeborenem AT-III-Mangel) wirksam zu sein.

Neueste Untersuchungen von Davie und Mitarbeitern weisen auch auf eine Hemmaktivität des Hirudins gegen Faktor IXa hin (31,76).

Bdelline

Stimuliert von R. Marx wurden von H. Fritz und Mitarbeitern weitere Protein-Proteinase-Inhibitoren im Blutegel entdeckt, die sog. Bdelline. Es handelt sich dabei um zwei Gruppen von Trypsin-Plasmin-Inhibitoren, Bdellin A und Bdellin B (16) genannt. Bdellin A hemmt zusätzlich zum Schweineplasmin besonders stark auch das Humanplasmin. Bdellin B ist außerdem ein starker Inhibitor des Akrosins. Akrosin ist als eines der Schlüsselenzyme des Befruchtungsvorganges anzusehen. Das Auftreten dieses Inhibitors im Blutegel wird im Zusammenhang mit seinem Zwitterdasein diskutiert.

Die Inhibitoren beider Bdellingruppen treten in multiplen Formen als sog. Isoinhibitoren auf. Die Bdelline A haben Molekulargewichte von 6 000 - 6 300. Sie weisen mit fünf Disulfidbrücken einen extrem hohen Gehalt (17%) an Cystin auf. Die Bdelline B haben Molekulargewichte von ~5 000. Die Struktur von Bdellin B₃ wurde von Krejci und Fritz partiell aufgeklärt (77) (Abbildung 7).

1970 wurde zum ersten Mal auf das Vorhandensein einer chymotryptischen Hemmaktivität in Blutegelextrakten hingewiesen (16). Die enzymatische Austestung eines Blutegelrohextraktes der Firma Plantorgan bestätigte das Vorkommen eines Chymotrypsin-Inhibitors;

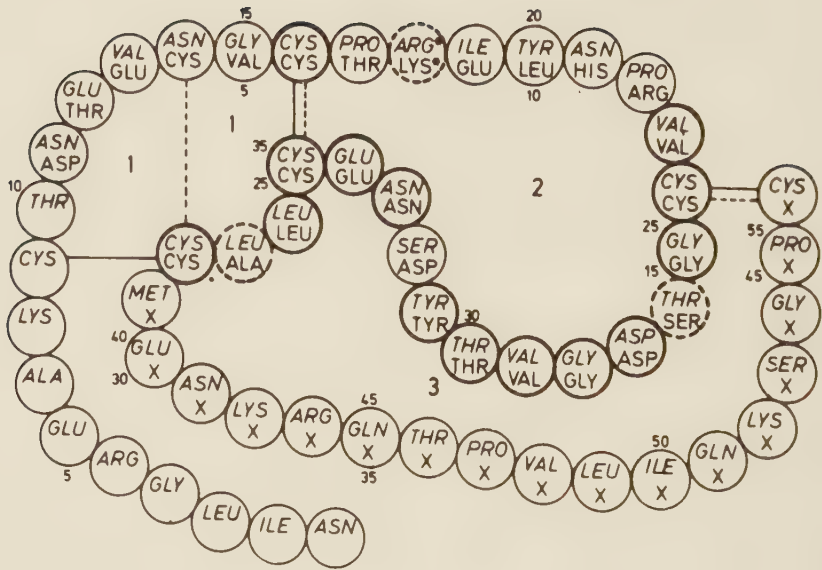


Abb.7 Struktur von Bdeltaellin B₃ (Sequenzvergleich mit dem sekretorischen Pankreas-Trypsin-Inhibitor)

Bdeltaellin B₃ untere, gerade Schrift
PSTI obere, schräge Schrift

außerdem wurde auch eine Hemmaktivität gegen Subtilisin und gegen die leukozytären Proteinasen Elastase und Kathepsin G gefunden.

B.3 Aufgabenstellung

Ausgehend von dem Befund der vielfältigen Hemmaktivität des Blut-
egelextraktes der Firma Plantorgan wurde mir zur Aufgabe ge-
stellt, die Inhibitoren gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die
leukozytären Proteinasen zu isolieren und zu charakterisieren.
Es stellte sich heraus, daß es sich im wesentlichen um zwei Iso-
inhibitoren, die Egline, handelt, die sich durch das Fehlen von
Cystin bzw. Cystein auszeichnen, ein für Protein-Proteinase-Inhi-
bitoren außergewöhnliches Strukturmerkmal. Durch diese Tatsache
stimuliert, wurde die Aufklärung der Primärstruktur einer der Iso-
inhibitoren angestrebt.

C. E R G E B N I S S E

C.1. Isolierung der Eglane

Als Ausgangsmaterial diente der Blutegelrohextrakt der Firma Plantorgan, ein auf Antithrombin-Einheiten (72) standardisiertes Lyophilisat, das durch Acetonfällung gewonnen wird. Dieses als "Rohhirudin" bezeichnete Produkt hemmt Thrombin, Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Subtilisin und die Proteinasen Elastase und Kathepsin G aus menschlichen polymorphkernigen Granulozyten.

C.1.1. Gelfiltration an Sephadex G-75

Im ersten Reinigungsschritt wurde der Rohextrakt mittels Gelchromatographie in drei Hemmstofffraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt (Abb.8):

Fraktion I, Molekulargewicht $\sim 38\ 000$

Sie enthält antitryptische und antiplasmatische Aktivität und nur Spuren von Hemmaktivität gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die Granulozytenenzyme.

Fraktion II, Molekulargewicht $\sim 6\ 000$

Sie enthält Hemmaktivität gegen Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase und Kathepsin G. Es stellte sich bei den weiteren Isolierungsarbeiten heraus, daß die chymotryptische Hemmaktivität immer mit der Hemmaktivität gegen Subtilisin und die Granulozytenenzyme parallel auftritt. Es handelt sich demnach offensichtlich um einen Inhibitor oder um eine Gruppe von Isoinhibitoren mit diesem Hemmspektrum,

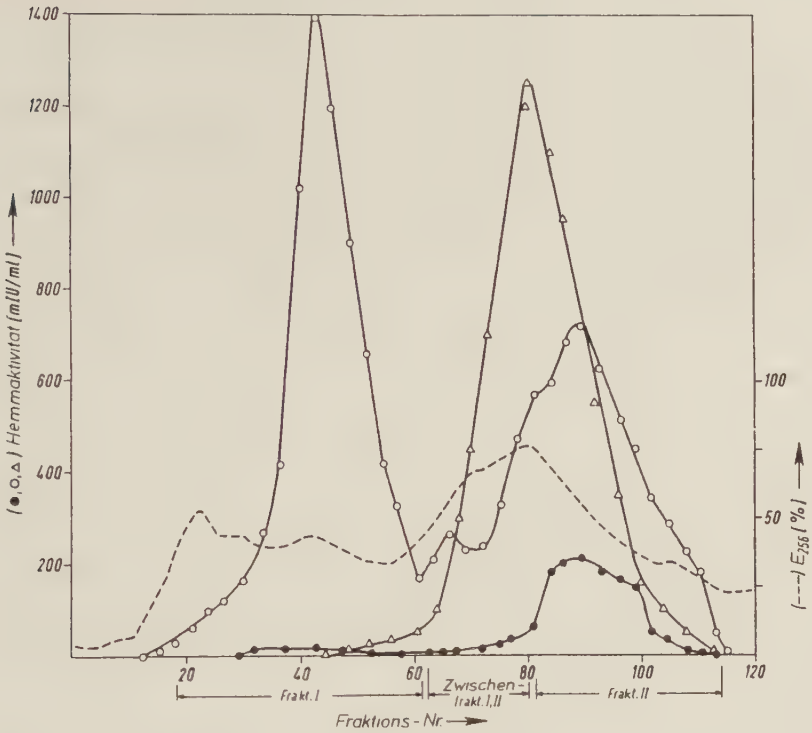


Abb.8 Gelfiltration des Blutegel-Rohextraktes an Sephadex G-75 (s. D.3.2.1.)

- Extinktion bei 256 nm
- Hemmaktivität gegen Trypsin
- Hemmaktivität gegen Chymotrypsin
- △—△ Hemmaktivität gegen Thrombin

die von uns als Eglone bezeichnet wurden.

Die Fraktion II weist außerdem eine starke Hemmung gegen Trypsin und Plasmin auf. Die Trypsin- und Plasminhemmfractionen wurden nicht weiter untersucht; es ist aber anzunehmen, daß diese Hemmaktivität u.a. den Bdeffinen zuzuordnen ist, die aus früheren Arbeiten über Blutegelwirkstoffe bekannt sind (s. B.2.).

Zwischenfraktion I/II, Molekulargewicht $\sim 8\ 000 - 9\ 000$

Sie enthält den größten Teil des Thrombin-Inhibitors Hirudin.

C.1.2. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Im zweiten Reinigungsschritt wurde die Fraktion II einer Anionenaustauschchromatographie bei pH 6,5 unterworfen (Abb.9). Dabei findet eine Auftrennung in mehrere tryptische und chymotryptische Hemmfractionen statt. Die Vermutung bestätigt sich, daß die Eglone in multiplen Formen als sogenannte Isoinhibitoren auftreten. Die beiden Hauptkomponenten, Eglin b und Eglin c, werden zusammen in der Fraktion IIb,c eluiert, zwei weitere Formen (in Fraktion e und f) erst nach Anschluß eines Salzgradienten. Der geringe Teil an chymotryptischer Hemmaktivität, der mit den inerten Proteinen im Ausschlußvolumen mitgerissen wird, wird verworfen. Die Bdeffine und das Hirudin, beides Inhibitoren mit niederen isoelektrischen Punkten, werden ebenfalls erst mit steigender Salzkonzentration eluiert (in Fraktion e, f und g), ebenso ein relativ trypsinspezifischer Inhibitor (in Fraktion d), der keine Plasmin- und Chymotrypsinhemmung aufweist.

Das Hemmspektrum und die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Hemspektrum und Ausbeuten der an DEAE-Cellulose aufgetrennten Inhibitorfraktionen (in Abb.9)

Fraktion II	Trypsin (%) °	Chymo- trypsin (%) °	Plasmin (%) °	Subtilisin (%) °	Thrombin (%) °	Granulozyten- Kathepsin G	
						Elastase (%) °	(%) ° a
b,c	+	7	++	63	(+)	-	
d	++	23	(+)	-	(+)	-	++
e	++	11	(+)	-	(+)	-	(+)
f	+	5	+	16	-	-	+
g	++	49	-	-	++	72	-

++ sehr starke Hemmung, + starke Hemmung, (+) schwache Hemmung, - keine Hemmung
 ° quantitative Verteilung der Hemmaktivitäten bezogen auf die Gesamtaktivität der Fraktion II
 a nicht bestimmt

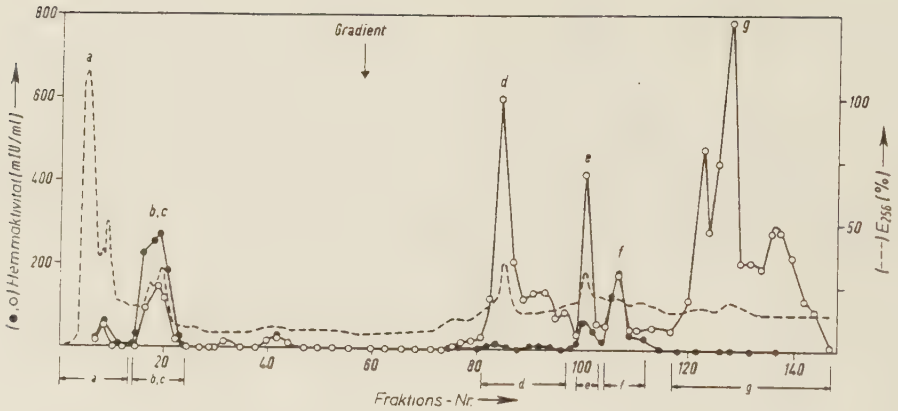


Abb. 9 Anionenaustauschchromatographie der Fraktion II an DEAE-Cellulose (s. D.3.2.2.)

- Extinktion bei 256 nm
- o---o Hemmaktivität gegen Trypsin
- Hemmaktivität gegen Chymotrypsin

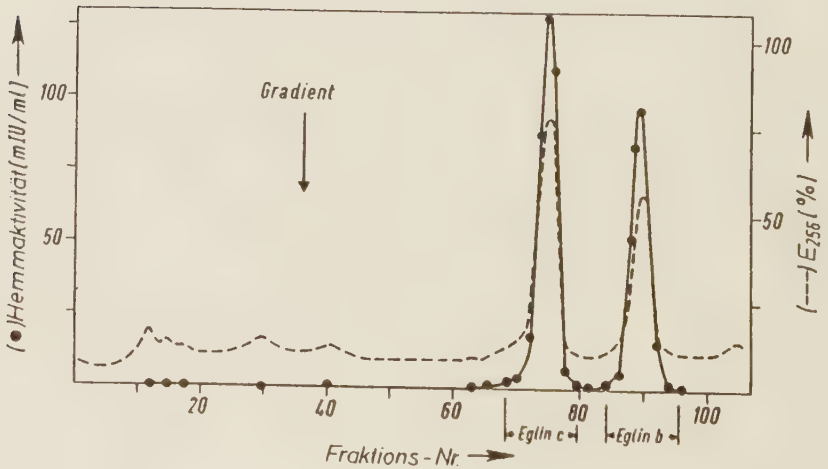


Abb. 10 Kationenaustauschchromatographie der Fraktion IIb,c an SP-Sephadex (s. D.3.2.3.)

- Extinktion bei 256 nm
- Hemmaktivität gegen Chymotrypsin

C.1.3. Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex

Die Feinreinigung und Trennung der beiden Isoinhibitoren Eglin b und Eglin c gelingt mittels einer Kationenaustauschchromatographie bei pH 5,5 (Abb.10). Die beiden Hemmstoffe werden nach Anschluß eines Salzgradienten in zwei symmetrischen, klar voneinander getrennten Fraktionen eluiert.

C.1.4. Entsalzung

Die einzelnen Fraktionen wurden vor jedem weiteren Reinigungsschritt entweder mittels wiederholter Ultrafiltration in einer Amiconzelle (Membran UM 05) oder mittels Gelfiltration an Fraktogel PGM 2000 entsalzt und anschließend lyophilisiert.

C.1.5. Bemerkungen zur Isolierung

Eine Übersicht über die einzelnen Isolierungsschritte, ausgehend vom Rohhirudin bis zu den homogenen Inhibitorfraktionen Eglin b und Eglin c, ist in Abbildung 11 zusammengefasst.

Die Ausbeuten, bezogen auf die Chymotrypsin-, Trypsin- und Plasminhemmung sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

C.2. Reinheitsprüfungen und Charakterisierung von Eglin b und Eglin c

Das symmetrische Elutionsprofil der inhibitorisch aktiven Fraktionen bei der Kationenaustauschchromatographie (s.Abb.10) ist ein erster Hinweis auf die Homogenität der Präparationen, die

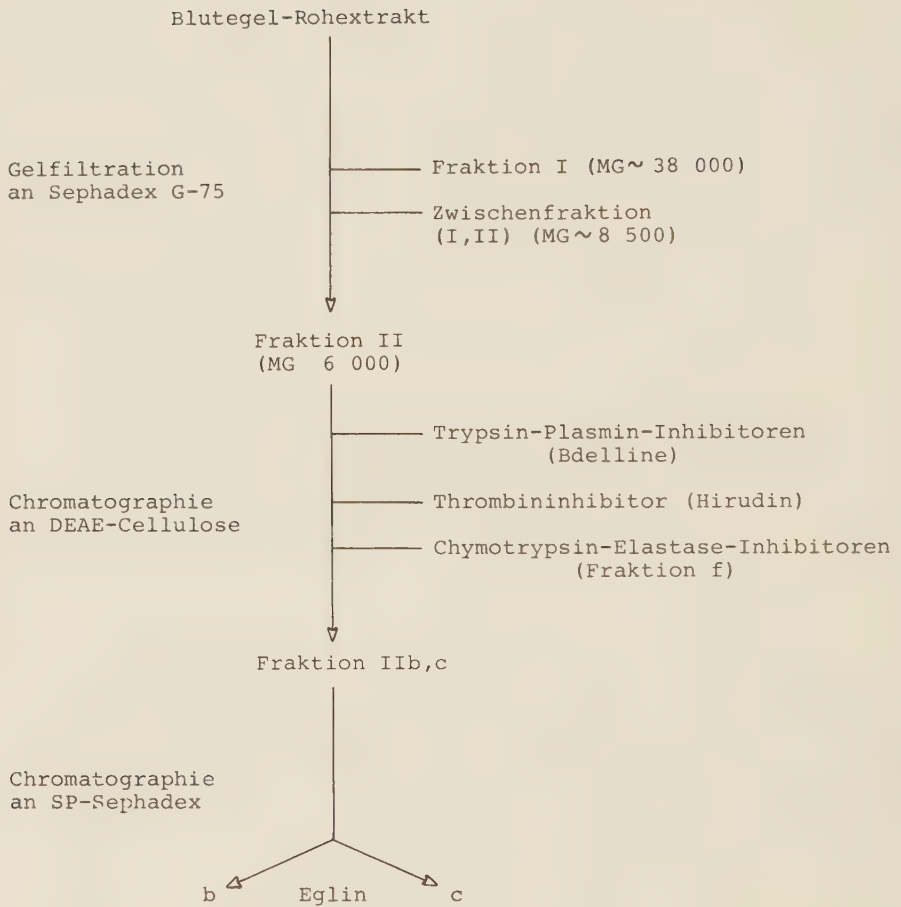


Abb.11: Isolierungsschema

Tabelle 4 Ausbeuten und spezifische Aktivität der Eglinfraktionen nach den einzelnen Isolierungsschritten

Isolierungsschritt	Fraktion	spezifische Aktivität ^o [mIU/mg] °	Ausbeute [% mIU]
Gelfiltration an Sephadex G-75	Ausgangsmaterial	5,5	
	Fraktion II	15,5	85
Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	Fraktion IIb,c	74	73
Kationenaustauschchromatographie an Sp-Sephadex	Eglin b Eglin c	115 120	68

^o gemessen gegen Chymotrypsin, Substrat SucPheNHnp

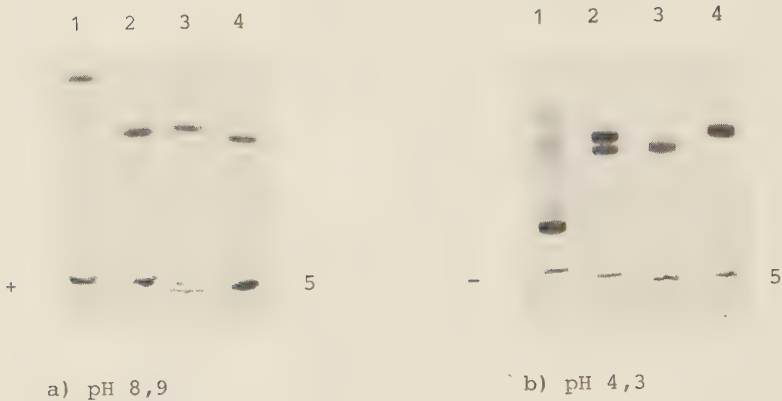


Abb.12

Disk-Elektrophoresen der Eglinpräparationen nach den einzelnen Reinigungsschritten (s. D.3.3.1.1.)

a) Elektrophorese bei pH 8,9

b) Elektrophorese bei pH 4,3

1 Fraktion II nach der Gelfiltration

2 Fraktion IIb,c nach der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

3 Eglin b

4 Eglin c nach der Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex

5 Marker zur Lauffrontmarkierung



Abb.13

SDS-Elektrophorese von Eglin c
(s. D.3.3.1.2.)

- 1 Referenzproteine
- 2 Eglin c
- 3 Referenzproteine + Eglin c
- 4 Marker zur Lauffrontmarkierung

durch elektrophoretische Methoden und die Bestimmung der terminalen Aminosäuren bestätigt wurde.

C.2.1. Elektrophoresen

C.2.1.1. Disk-Elektrophorese

Die fortschreitende Reinigung der Inhibitorfraktionen nach jedem Isolierungsschritt ist eindrucksvoll durch die Disk-Elektrophoresen in Polyacrylamid-Gelen dargestellt. Es wurden Elektrophoresen in saurem (pH 4,5) und basischem (pH 8,3) Milieu durchgeführt.

Für Eglin b und Eglin c wurde trotz großer Probenmenge jeweils nur eine Bande gefunden (Abb.12).

C.2.1.2. SDS-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat nach Reduktion der Proben zeigt für Eglin b und Eglin c nur eine Bande (Abb.13).

Die elektrophoretische Mobilität beider Egline ist identisch, die Banden liegen im gleichen Wanderungsbereich. Die Lokalisation der Proteinbanden, bezogen auf einen Referenzlauf mit Markerproteinen, weist auf ein Molekulargewicht für die Egline im Bereich des BPTI (MG: 6 500) hin.

C.2.1.3. Isoelektrische Fokussierung

Es wurde eine isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidflächgelen mit Ampholine pH 3,5 - 8 durchgeführt. Beide Egline treten als definierte, einheitliche Bande auf. Die isoelektrischen Punkte liegen für Eglin b bei $6,6 \pm 0,3$ und für Eglin c bei $pH\ 6,45 \pm 0,3$ (Abb.14).

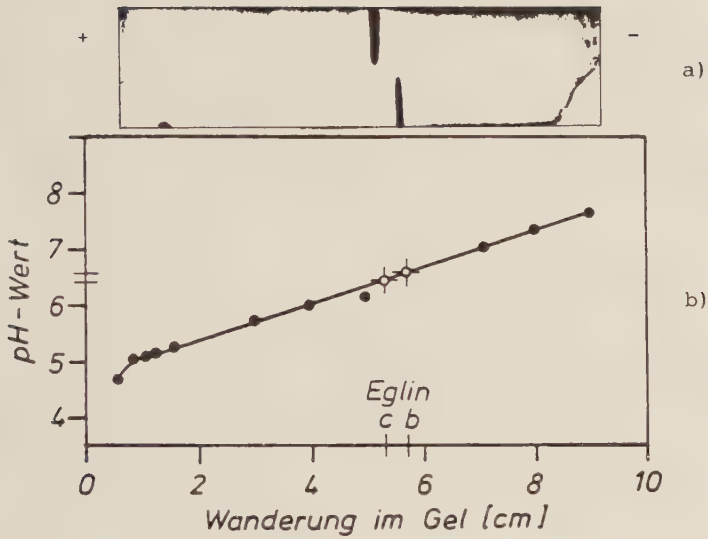


Abb.14 a) Eglin b und Eglin c nach Anfärbung im Polyacrylamidgel
b) Graphische Darstellung des pH-Gradienten im Polyacrylamidgel unter Kontrolle der zugesetzten Referenzproteine und Zuordnung der Egline

C.2.2. Endgruppenbestimmung

C.2.2.1. N-terminale Aminosäure

Die N-terminale Aminosäure wurde mit der Dansyltechnik (78) bestimmt. Diese Methode ist als eines der empfindlichsten Reinheitskriterien anzusehen.

Als einziger N-terminaler Rest wurde sowohl für Eglin b als auch für Eglin c Threonin gefunden.

C.2.2.2. C-terminale Aminosäure

Die Bestimmung der C-terminalen Aminosäure wurde mit Carboxypeptidase Y aus Bäckerhefe durchgeführt (79).

Die Carboxypeptidase hat gegenüber ähnlichen Exopeptidasen den Vorteil eines umfassenden Spaltungsspektrums. Im Gegensatz dazu ist z.B. die Spaltungsspezifität von Carboxypeptidase A auf vorwiegend aromatische bzw. langkettige aliphatische Reste, die der Carboxypeptidase B auf basische Reste beschränkt. Demgegenüber vermag Carboxypeptidase Y nahezu jede Aminosäure abzuspalten. Dieses Enzym wurde von mehreren Arbeitsgruppen eingehend charakterisiert (80-82) und es sind Methoden für eine sequentielle C-terminale Bestimmung ausgearbeitet worden (81,79).

Bei den Experimenten mit den Eglinen stellte sich heraus, daß die Inkubation mit Carboxypeptidase Y in Pyridinacetat-Puffer pH 6,0 oder 4,0 nicht zu einer Freisetzung C-terminaler Aminosäuren führt. Erst nach Zusatz von 0,5% Natriumdodecylsulfat erfolgte eine sequentielle Hydrolyse. In Gegenwart dieses denaturierenden Agens wird die Aktivität der Carboxypeptidase Y nicht eingeschränkt, Proteinsubstrate aber, die in nativem Zustand resistent sind, werden enzymatisch angreifbar. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für andere native Proteine, z.B. Pankreas-Ribonuklease (81,79) gemacht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung 15 dargestellt. Die Endgruppenbestimmungen weisen für Eglin b und Eglin c sowohl für die N-terminale (Threonin) als auch für die C-terminalen Aminosäuren (-Valin-Glycin) völlige Identität auf.

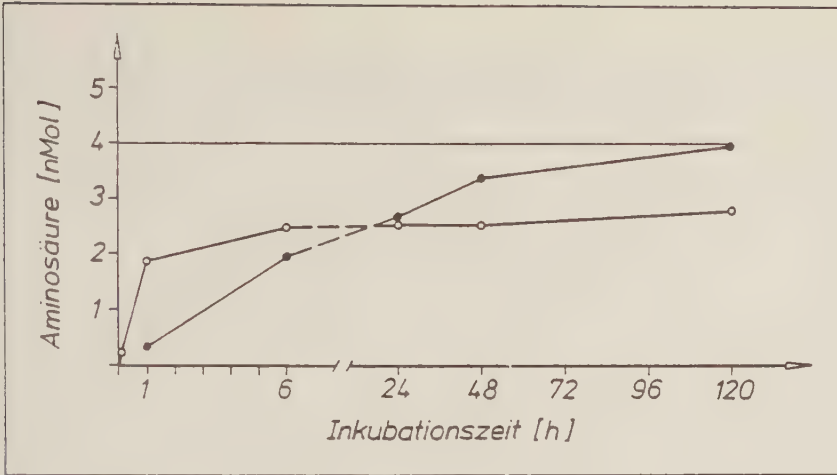


Abb.15a Eglin b (4 nMol/Inkubationsansatz)

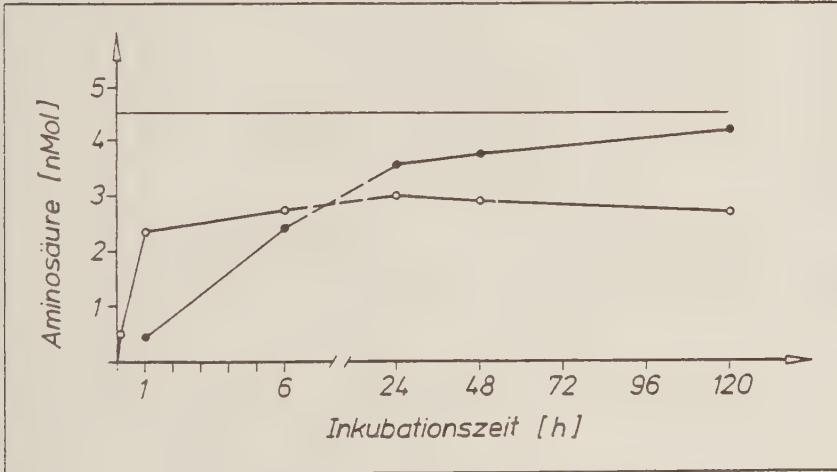


Abb.15b Eglin c (4,5 nMol/Inkubationsansatz)

Abb.15 Bestimmung der C-terminalen Aminosäure (s. D.3.3.4.)

○ — freigesetztes Glycin
● — freigesetztes Valin

Tabelle 5 Bestimmung der C-terminalen Sequenz von Eglin b und Eglin c mit Carboxypeptidase Y

Zur Hydrolyse mit Carboxypeptidase Y eingesetzte Menge Protein pro Ansatz			
Eglin b	4 nMol	Eglin c	4,5 nMol
Freigesetzte Aminosäuren in der Reihen- folge ihres Erscheinens			
Glycin	2,8 nMol	Glycin	2,7 nMol
Valin	4,0 nMol	Valin	4,2 nMol
andere Aminosäuren	0,6 nMol	andere Aminosäuren	0,62 nMol
C-terminale Sequenz			
Eglin b		Eglin c	
...-Val-...-Val-Gly-OH		...-Val-...-Val-Gly-OH	

Das Ergebnis der C-terminalen Aminosäurebestimmung erlaubt außerdem die Interpretation, daß ein weiterer Valinrest am Sequenzende der Egline lokalisiert sein muß, da die Quantität der freigesetzten Valinreste die des Glycins um 50% überschreitet.

C.2.3. Aminosäurezusammensetzung von Eglin b und Eglin c

Die Aminosäurezusammensetzung, in Tabelle 6 wiedergegeben, ist für beide Isoinhibitoren nahezu identisch. Es scheint allerdings, daß ein Aminosäureaustausch in den beiden Proteinen stattgefunden hat, da Eglin b einen Histidinrest und Eglin c einen Tyrosinrest zusätzlich enthält.

Dieser Histidin-Tyrosin-Austausch wird sichtbar durch die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität und Affinität zu Ionenaustauschern. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß auch der Amidierungsgrad diese Unterschiede mitbeeinflußt.

Beide Inhibitoren bestehen aus 70 Aminosäuren; es errechnet sich daraus ein Molekulargewicht von 8 073 bzw. 8 099. Die Egline enthalten kein Methionin und Isoleucin, dagegen einen relativ hohen Prozentsatz an Valin, Tyrosin und Phenylalanin.

Als überraschendstes Ergebnis der Aminosäureanalysen ist das Fehlen von Cystein bzw. Cystin zu werten. In der Einleitung wurde bereits auf den meist ungewöhnlich hohen Gehalt an Cystin in Proteinase-Inhibitoren hingewiesen, der als allgemeines Charakteristikum dieser Proteinklasse sowohl hinsichtlich der chemischen Struktur als auch in Zusammenhang mit der biologischen Wirksamkeit angesehen wird.

Der Gehalt an Cystein bzw. Cystin wurde durch Perameisensäureoxydation (83) bestimmt. Um auszuschließen, daß bei dieser Oxydation nicht ungewöhnliche Abbaureaktionen des Cysteins stattgefunden haben, die falsche Werte vorzutauschen in der Lage wären, wurden ergänzende Untersuchungen vorgenommen.

Tabelle 6 Aminosäureanalyse von Eglin b und Eglin c (s. D.3.3.2.)

	Eglin b			AS/Mol°	Eglin c			AS/Mol°
	20 h	40 h	72 h		20 h	40 h	72 h	
Asp	6,74	6,79	6,70	7	6,76	6,70	6,70	7
Thr	4,53	4,34	4,07	5	4,52	4,32	4,08	5
Ser	3,04	2,62	2,48	3	2,93	2,70	2,31	3
Glu	7,25	7,26	7,17	7	7,16	7,16	7,11	7
Pro	6,15	6,14	6,49	6	5,9	6,22	6,22	6
Gly	5,11	5,16	5,19	5	5,18	5,18	5,27	5
Ala	1,29	1,27	1,32	1	1,16	1,21	1,17	1
Cys ^a								
Val	10,02	10,81	10,64	11	10,1	10,78	10,84	11
Met ^a								
Ile								
Leu	4,71	4,77	4,71	5	4,83	4,74	4,83	5
Tyr	3,86	4,26	3,78	4-5	5,12	4,52	4,61	5-6
Phe	4,76	4,94	4,89	5	4,93	4,94	4,93	5
His	4,07	3,82	3,47	4	2,99	3,70	3,26	3
Lys	2,34	2,45	2,30	2	2,18	1,55	2,23	2
Arg	3,76	3,85	3,71	4	2,60	3,80	3,84	4
Trp ^b	0,62			0-1	0,72			0-1
N-Terminus				Thr	Thr			
Gesamt				70	70			
Molekulargewicht				8073	8099			

C.2.4. Reduktion und Carboxymethylierung

Eglin b und Eglin c wurden reduziert und carboxymethyliert (84) mit dem Ziel einer selektiven Modifikation der Inhibitoren am Cystein bzw. Cystin. Durch diese Modifikation ändert sich die elektrische Ladung der Moleküle insofern, als für jeden Cysteinrest eine und für jedes Cystin zwei zusätzliche negative Ladungen in die Moleküle eingeführt werden. Eventuell vorhandene Cysteine bzw. Cystine können auf diese Weise in der Disk-Elektrophorese über die veränderte elektrophoretische Mobilität erkannt werden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16a für Eglin c dargestellt. Nativer und "derivatisierter" Inhibitor haben die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in der Disk-Elektrophorese; auch die zur Kontrolle durchgeführte SDS-Elektrophorese (Abb.16b) zeigt ein identisches Verhalten für beide Inhibitoren.

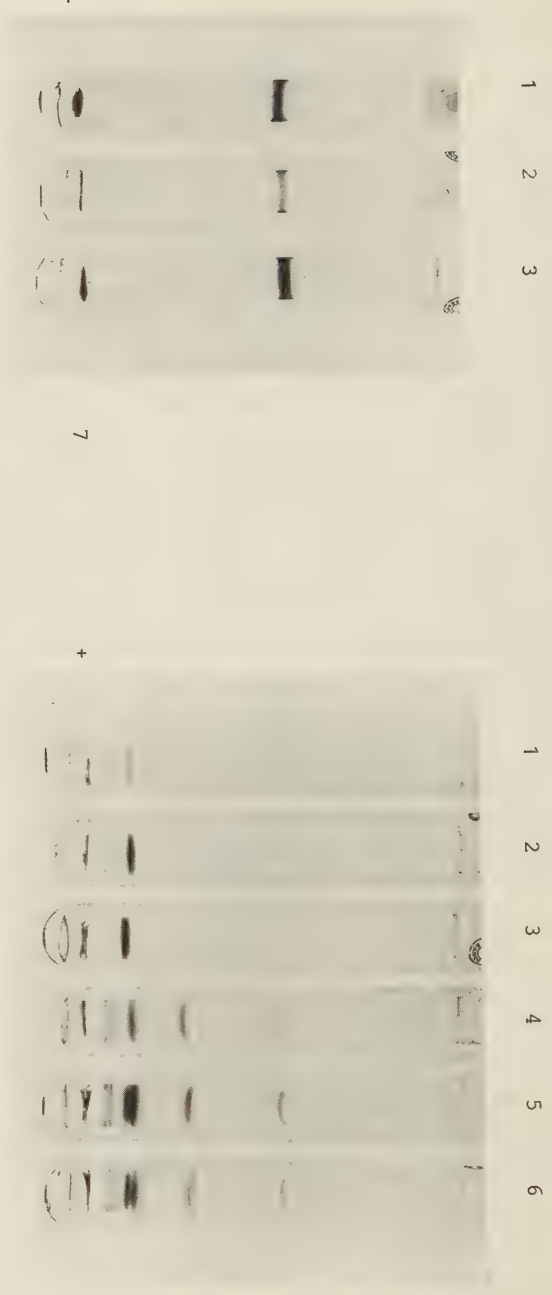
Auf Grund dieser Experimente und in Anbetracht der Tatsache, daß die Egline nach der Reduktion und Carboxymethylierung ihre volle Hemmaktivität beibehalten, kann das Ergebnis der Aminosäureanalyse als zutreffend akzeptiert werden.

Eglin b und Eglin c besitzen somit ein für Inhibitoren außergewöhnliches Strukturmerkmal, da sie weder Cystein noch eine Disulfidbrücke enthalten.

Auf dieses Strukturmerkmal wurde bereits in der Einleitung hingewiesen und dieser Punkt wird in der Diskussion wieder aufgegriffen.

C.2.5. Stabilität

Die Untersuchung der pH-Stabilität und Hitzestabilität hat ergeben, daß die Hemmaktivität der Egline über einen sehr großen pH-Bereich auch bei erhöhten Temperaturen bis 80°C erhalten bleibt. Selbst das Erhitzen auf 80°C bei pH 2 für 10 Minuten führt nicht



- 44 -

a) Disk-Elektrophorese, pH 4,3

b) SDS-Elektrophorese

Abb.16 Disk- und SDS-Elektrophorese von nativem und derivatisiertem Eglin c (s.D.3.3.3.)

- | | | | |
|---|-----------------------------------|---|--|
| 1 | natives Eglin c | 5 | Referenzproteine + natives Eglin c |
| 2 | derivatisiertes Eglin c | 6 | Referenzproteine + derivatisiertes Eglin c |
| 3 | natives + derivatisiertes Eglin c | 7 | Marker zur Lauffrontmarkierung |
| 4 | Referenzproteine | | |

zur Inaktivierung. Eine Zerstörung der Hemmaktivität erfolgt allerdings bei pH 13 schon nach 10 Minuten.

C.2.6. Hemmcharakteristik

Das Hemmspektrum der Egline ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Egline sind starke Inhibitoren für Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Sie hemmen dagegen nur schwach Rinder-Trypsin, Schweinepankreas-Elastase und Eber-Akrosin und besitzen keine Hemmaktivität gegenüber Schweine-Plasmin, Rinder-Thrombin und Schweinepankreas-Kallikrein.

Es wurden Titrationskurven (Abb.17) erstellt, aus denen nach der Methode von Green und Work (85) die Dissoziationskonstanten der Komplexe berechnet wurden. Es handelt sich dabei um eine graphische Bestimmungsmethode und die so ermittelten Konstanten sind als Näherungswerte (± 10) zu interpretieren. Man kann trotzdem zweifelsfrei feststellen, daß die Egline mit Chymotrypsin, Subtilisin und den granulozytären Proteinasen ungewöhnlich stabile Komplexe bilden. Die Dissoziationskonstanten für diese Enzym-Inhibitor-Komplexe liegen bei $10^{-10} - 10^{-11}$ M (Tab.7). Die Egline gehören damit zu den stärksten Inhibitoren der menschlichen granulozytären Elastase und des Kathepsin G, die man bisher gefunden hat.

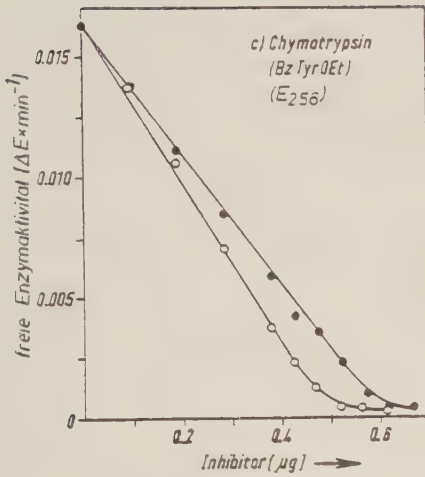
Aus dem molaren Verhältnis von eingesetztem Enzym und Inhibitor errechnet sich aus den Titrationskurven (Abb.17) bei 50%iger Hemmung die Bildung äquimolarer Komplexe zwischen Eglin und Chymotrypsin, Subtilisin sowie Kathepsin G. Dagegen würde die Granulozyten-Elastase im Molverhältnis 1:2 (Enzym:Inhibitor) mit dem Eglin reagieren. Die Titration wurde hier mit einer Elastasepräparation durchgeführt, die uns freundlicherweise von K. Ohlsson zur Verfügung gestellt wurde. Für unsere Berechnungen haben wir die Konzentrationsangaben von K. Ohlsson übernommen; es wurde keine Titration der Elastase von uns durchgeführt.

Tabelle 7 Hemmspektrum und Inhibitorkonstanten von Eglin b und Eglin c

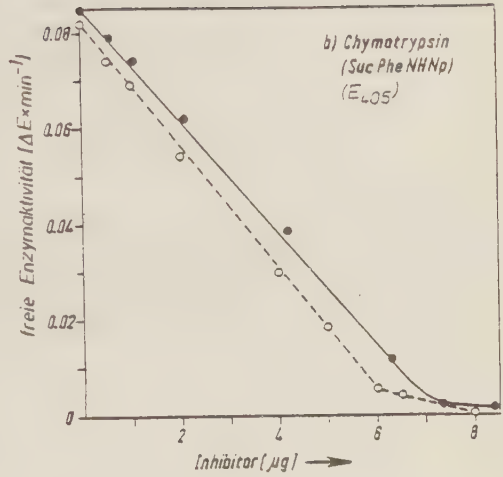
Proteinase	Inhibition	Inhibitorkonstante [10^{-10} M]	
		Eglin b	Eglin c
Chymotrypsin ^a	++	2,2	4,2
SUPHEPA	++	0,23	0,35
BTEE			
Elastase aus Granulozyten ^b	++	2,2	0,99
Kathepsin G aus Granulozyten ^b	++	3,2	1,8
Subtilisin	++	1,5	1,2
Trypsin ^a	(+)		
Pankreas-elastase ^c	(+)		

++ starke, (+) schwache Hemmung; ^a vom Rind, ^b vom Menschen, ^c vom Schwein

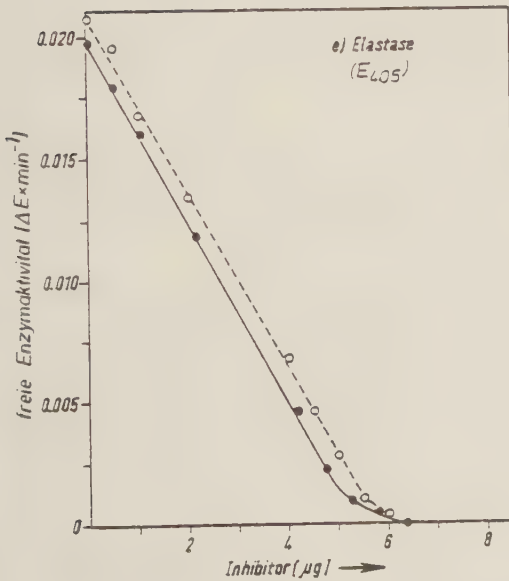
a)



b)



c)



d)

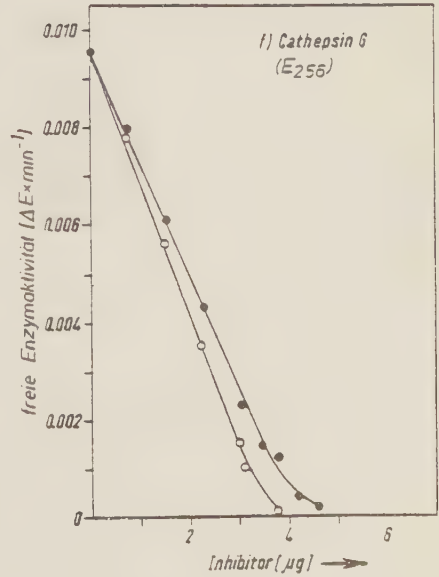
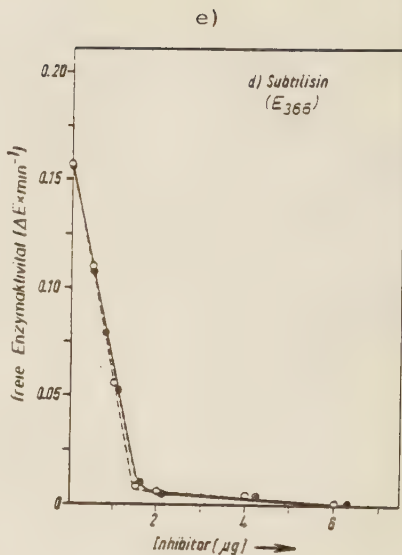


Abb.17 a)-d) Erklärung siehe nächste Seite

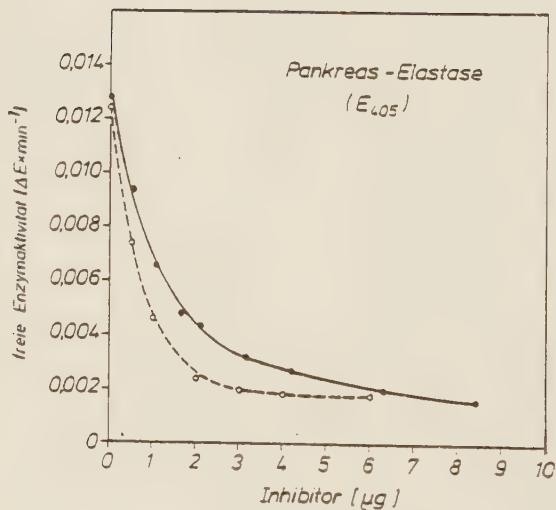
Abb.17 a)-g) Titration von Eglin b und Eglin c mit verschiedenen Proteinasen (s. D.3.3.5)

●—● Eglin b
○---○ Eglin c

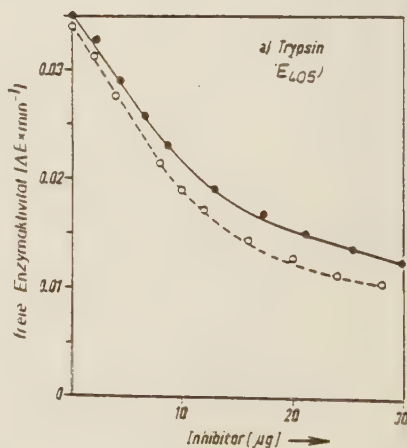
Konstante Mengen Proteinase wurden mit steigenden Mengen Inhibitor inkubiert. Nach 5 min wurde durch Substratzugabe die Reaktion gestartet und die nicht gehemmte, freie Enzymaktivität gemessen (s. D.3.1.).



f)



g)



Da mit derselben Enzympräparation ähnliche ungewöhnliche molare Verhältnisse für den HUSI I und den DSI gefunden wurden (166), ist anzunehmen, daß die zur Titration tatsächlich eingesetzte Menge an Granulozytenelastase nicht dem angegebenen Wert entsprach. Wie in der Diskussion ausgeführt, ist auch für dieses Enzym die Bildung eines 1:1 Komplexes zu erwarten.

Für Trypsin und Pankreas-Elastase muß ein 10 bzw. 20-facher molarer Überschuß an Inhibitor eingesetzt werden, um ebenfalls eine 50%ige Hemmung zu erreichen; d.h., die Egline besitzen nur eine schwache Hemmaktivität gegenüber diesen beiden Enzymen.

Die Komplexbildung von Eglin mit Chymotrypsin konnte überzeugend in einem Experiment demonstriert werden (Abb. 18). Konstante Mengen Eglin wurden mit steigenden Mengen Chymotrypsin bis zum äquimolaren Verhältnis inkubiert und die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Man beobachtet dabei eine parallel zur Intensitätszunahme der Komplexbande entsprechende Intensitätsabnahme der Inhibitorbande. Die vollständige Komplexbildung des Inhibitors wird bei Zugabe der äquimolaren Enzymmengen durch das Auftreten von nurmehr einer Bande, der Komplexbande, belegt.

C.3. Bestimmung der Sequenz von Eglin c

Alle Sequenzierungsläufe sowohl des nativen Eglins als auch der durch enzymatischen Abbau gewonnenen Peptide erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Eulitz (Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München). Die Analysen wurden am Beckman-Sequencer, Modell 890C durchgeführt, dem das automatische Verfahren des sequentiellen Proteinabbaus zu Grunde liegt (86).

Die Identifizierung und quantitative Auswertung der abgebauten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren (PTH-Aminosäuren) erfolgte mittels Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie und zum Teil durch

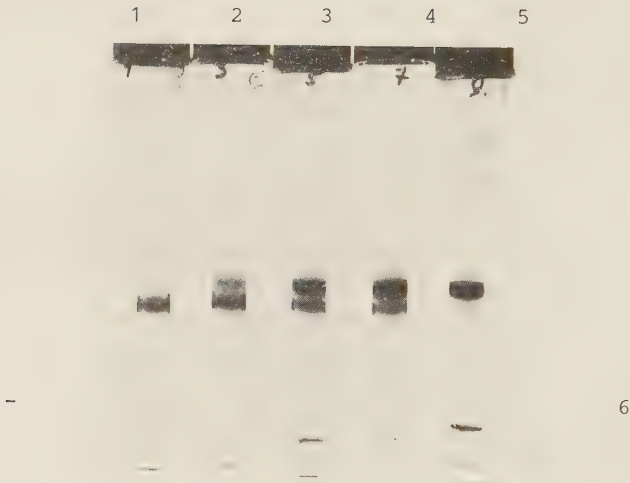


Abb.18 Darstellung der Komplexbildung zwischen
Eglin c und Chymotrypsin durch Disk-
Elektrophorese

Konstante Mengen Eglin c ($14,3 \mu\text{g}$) wurden
mit steigenden Mengen Chymotrypsin ($0-70 \mu\text{g}$)
in Pufferlösung, pH 7,8, für 5 Minuten inkubi-
ert und anschließend in der Disk-Elektro-
phorese (s. D.3.3.1.1.) aufgetrennt.

- 1 Eglin c
- 2-5 Eglin c mit steigenden Mengen Chymotrypsin
- 6 Marker zur Lauffrontmarkierung

Rückhydrolyse der PTH-Aminosäuren mit Jodwasserstoffsäure und anschließender Aminosäureanalyse. Bei der Nachweismethode durch Rückhydrolyse werden Asparagin und Glutamin als Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure identifiziert; Threonin wird z.T. zu α -Buttersäure derivatisiert, Serin wird total zerstört. Die Ausbeuten der rückhydrolysierten Aminosäuren sind besonders für Histidin, Lysin und Arginin gering (87).

Da Eglin c in größerer Menge im Rohextrakt enthalten ist als Eglin b, wurde dieser Isoinhibitor für die Sequenzierung ausgewählt.

C.3.1. Automatischer Edman-Abbau des nativen Eglin c

Es wurden drei Sequenzierungsläufe (S_1 , S_2 und S_3) mit 4,87 mg (= 600 nMol), 5,06 mg (= 625 nMol) und 5,45 mg (= 673 nMol) durchgeführt. Eine vorherige Modifikation, d.h. Reduktion und Carboxymethylierung, war nicht erforderlich, da Eglin weder Cystein noch Cystin enthält.

Das qualitative und quantitative Ergebnis ist in Tabelle 8 und Abbildung 19 dargestellt.

Der dritte Sequenzierungslauf wurde unternommen in der Hoffnung, einen erfolgreichen Abbau bis Position 50-60 zu erreichen. Aus diesem Grunde wurde dem Ansatz Polybren (93) zugesetzt, das die Auswaschung kürzerer Peptide durch die Lösungsmittel während des sequentiellen Abbauprogramms zurückdrängt. Außerdem war geplant, ab Position 35 die PTH-Aminosäuren neben den genannten Methoden zusätzlich durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie zu identifizieren. Dieses Verfahren ist um eine Zehnerpotenz empfindlicher als die Gaschromatographie und ermöglicht den Nachweis von 0,5 - 1 nMol der PTH-Aminosäure.

Leider mußte die Sequenzierung nach Position 31 eingestellt werden, da eine Zyklisierung des Glutamins zu Pyroglutamat stattgefunden hatte. Diese Reaktion blockierte einen weiteren Abbau und wurde möglicherweise durch das hydrophile Polybren begünstigt.

Tabelle 8 Ergebnis des Sequenzierungslaufes S₃ von nativem Eglin c

673 nMol Eglin c eingesetzt, 0,25 M Quadrol +
3 mg Polybren

Schritt	Amino- säure	Nachweis- methode	Ausbeute nMol
1	Thr	Dc,Gc	
2	Glu	Dc,Gc	250
3	Peh	Dc,Gc	248
4	Gly	Dc,Gc	154
5	Ser	Dc,Gc	171
6	Glu	Dc,Gc	169
7	Leu	Dc,Gc	285
8	Lys	Rh,Gc	
9	Ser	Dc,Gc	118
10	Phe	Dc,Gc	243
11	Pro	Dc,Gc	109
12	Glu	Dc,Gc	
13	Val	Dc,Gc	293
14	Val	Dc,Gc	306
15	Gly	Dc,Gc	97
16	Lys	Dc,Rh	
17	Thr	Dc,Gc	327
18	Val	Dc,Gc	164
19	Asn	Rh,Dc	34
20	Gln	Rh,Dc	19
21	Ala	Dc,Gc	286
22	Arg	Rh,Dc	
23	Glu	Rh,Dc,Gc	40
24	Tyr	Dc,Gc	141
25	Phe	Dc,Gc	145
26	Thr	Dc,Gc	195
27	Leu	Dc,Gc	198
28	His	Dc,Rh	
29	Thr/Tyr	Dc,Gc	113/63
30	Pro	Dc,Gc	40
31	Glu	Dc,Gc	

Dc Dünnschichtchromatographie
Gc Gaschromatographie
Rh Rückhydrolyse

Schritt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.Lauf (S1)	Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Gln	Leu	Lys		Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly		Thr	Val	Asn	Gln
2.Lauf (S2)	Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu			Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly		Thr	Val	Asn	
3.Lauf (S3)	Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Asn	Gln
Sequenz	Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Asn	Gln
Schritt	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1.Lauf (S1)	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu		Tyr	Pro		Tyr		Val	Tyr	Phe	Leu	Thr	Glu	Gly
2.Lauf (S2)	Ala		Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu		Tyr	Pro		Tyr	Gln	Val	Tyr	Phe	Leu	Thr		Gly
3.Lauf (S3)	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu		Thr	Pro	Gln									
Sequenz	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	His	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Asn	Val	Tyr	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly
Schritt	41	42																		
1.Lauf (S1)																				
2.Lauf (S2)																				
3.Lauf (S3)																				
Sequenz																				

Abbildung 19 Ergebnis der drei Sequenzierungsläufe von nativem Eglin

Die Information aus dieser N-terminalen Teilsequenz war für die weitere Strategie der Sequenzierung nützlich, da die Position der beiden Lysine, der meisten Glutamine bzw. Glutaminsäuren, des einzigen Alanins und eines Arginins geklärt war.

Da Eglin insgesamt nur 4 Arginine enthält, wurde eine tryptische Spaltung erwogen. Trypsin hydrolysiert sehr spezifisch nur die Peptidbindungen basischer Reste; für Eglin musste also mit dem Auftreten von 7 Peptiden (2 Lysine, 4 Arginine) gerechnet werden. Von diesen Peptiden sind die lysinhaltigen und 2 argininhaltige auf Grund der bekannten N-terminalen Teilsequenz problemlos zuzuordnen. Das C-terminale Peptid ist ebenfalls leicht erkennbar, da es weder Lysin noch Arginin enthält. Es bleiben demnach 2 Arginin-Peptide übrig, deren Zuordnung durch Überlappungspeptide zu klären ist.

Die sehr spezifischen chemischen Spaltungen am Methionin durch Bromcyan (88) und am Tryptophan durch BNPS-Skatol (89) sind für Eglin auf Grund des Fehlens dieser beiden Aminosäuren nicht anwendbar. Diese chemischen Hydrolysen sind für die Sequenzaufklärung deshalb so wertvoll, weil sie sehr selektiv ablaufen. Zudem treten Methionin und Tryptophan in Proteinen gewöhnlich in geringer Menge auf, sodaß bei der Fragmentierung nur wenige große Bruchstücke anfallen, die die Zuordnung kleiner Peptide aus den enzymatischen Hydrolysen erleichtern oder sogar erst ermöglichen.

C.3.2. Tryptische Spaltung

Es wurde zunächst eine argininspezifische Spaltung mit Trypsin vorgenommen, um die Anzahl der resultierenden Peptide möglichst gering zu halten. Zu diesem Zwecke wurde Eglin in schwach basischer Lösung mit Citraconsäureanhydrid umgesetzt (90), wobei der Citraconsäurerest an die freien Aminogruppen der Lysine gekoppelt wird und somit diese Reste dem enzymatischen Angriff durch Trypsin entzogen sind. Nach der tryptischen Spaltung und Inaktivierung des Enzyms können die Lysin-Schutzgruppen im Säuren leicht wieder ab-

gespalten werden.

Dieses Experiment wurde dreimal bei unterschiedlichen Bedingungen (6 und 24 Stunden bei Raumtemperatur, 6 Stunden bei 37°C, 6 Stunden mit 50 Mol% Trypsin) ohne Erfolg durchgeführt; die Spaltungsrate war jedesmal minimal. Offensichtlich haben die Citraconsäure-Schutzgruppen zu einer Resistenz des Inhibitors gegen Trypsin geführt.

Nach diesen Erfahrungen wurde der native Inhibitor eingesetzt. Die tryptische Spaltung (mit 2 Mol% Enzym) wurde an Hand der Hemmaktivitätsabnahme verfolgt. Nach 4 Stunden waren 64% des Inhibitors inaktiviert.

C.3.2.1. Isolierung der tryptischen Peptide

Der tryptische Inkubationsansatz wurde entsprechend dem Trennschema in Abbildung 20 säulenchromatographisch aufgetrennt. Die Bezeichnung der Peptide T₁-T₈ erfolgte gemäß ihrer Aufeinanderfolge vom N-Terminus ausgehend.

Die Reinheit der isolierten Peptide wurde an Hand der N-terminalen Aminosäure und der Aminosäureanalyse überprüft.

Die Elution der Peptide wurde spektralphotometrisch bei 276 nm und bei 206 nm verfolgt. Außerdem wurden aliquote Teile der eluierten Fraktionen dünnenschichtchromatographisch an HPTLC-Platten (high pressure thin layer chromatography) aufgetrennt und mit Fluram angefärbt (91,92), um die Peptide zusätzlich zur Extinktionsmessung zu detektieren. Diese Methode ermöglichte erste Aussagen über die Reinheit der einzelnen eluierten Fraktionen.

C.3.2.1.1. Gelchromatographie an Biogel P30

Eine grobe Auftrennung der tryptischen Peptide aus dem Inkubationsansatz wurde mittels Gelchromatographie an Biogel P30 in 50%-iger Essigsäure erreicht (Abb.21).

Es wurden 6 Fraktionen gesammelt:

Die erste Fraktion 1.1 weist tryptische Aktivität auf, sie besteht also aus dem zur Inkubation eingesetzten Trypsin.

Fraktion

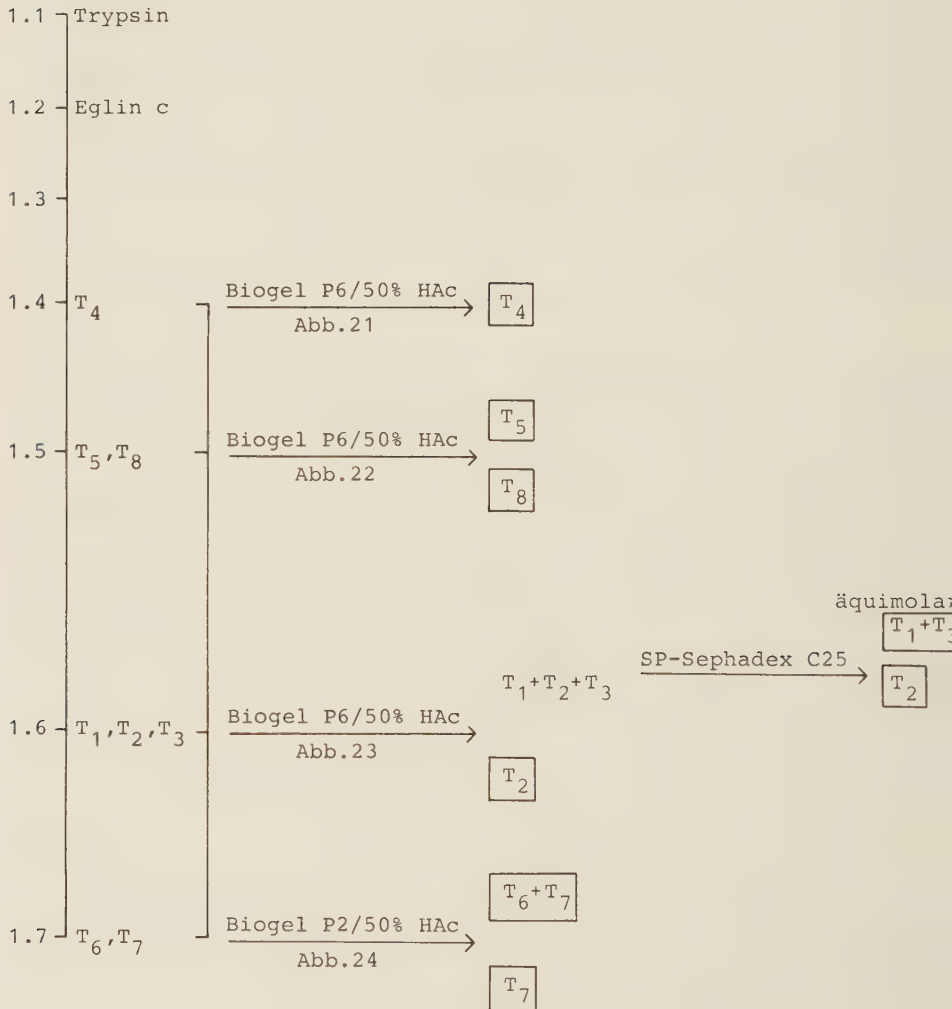


Abbildung 20

Trennschema für die Peptide der tryptischen Spaltung von Eglin c

Die zweite Fraktion 1.2 enthält ungespaltenes Eglin; die N-terminale Aminosäure, die Aminosäureanalyse und die Hemmaktivität stimmen mit den Daten des nativen Inhibitors überein. Dieser enzymatisch nicht hydrolysierte Inhibitor ist trotz langer Verweilzeit auf der Gelchromatographiesäule (in 50%iger Essigsäure.) uneingeschränkt aktiv, man findet 90% der im tryptischen Inkubationsansatz enthaltenen Hemmaktivität wieder.

Fraktion 1.3 enthält wahrscheinlich nicht vollständig gespaltenes Protein, das auf Grund der geringen Menge nicht weiter untersucht und gereinigt wurde.

Die folgenden Fraktionen 1.4 - 1.7 bestehen aus unreinen Peptiden bzw. Peptidgemischen, die durch Rechromatographie gereinigt wurden.

C.3.2.1.2. Rechromatographie an Biogel P6

Biogel P6 hat eine Ausschlußgrenze für Proteine mit Molekulargewichten über 6 000 und eignet sich besonders für die Auftrennung von Peptiden mit Molekulargewichten von 2 000 - 5 000.

Die Fraktionen 1.4 und 1.5 wurden erfolgreich über diese Matrix in 50%iger Essigsäure gereinigt (Abb.22,23). Es resultierten die Peptide T4 (aus Fraktion 1.4), T5 und T8 (aus Fraktion 1.5). Die Rechromatographie der Fraktion 1.6 an Biogel P6 (Abb.24) führte nur zu einer Abtrennung eines Teils des Peptids T2; der Rest des Gemisches, das sich aus zwei Okta- und einem Sextapeptid zusammensetzte, wurde ungetrennt eluiert. Das Elutionsprofil des Adsorptionschromatogramms weist auf eine Überladung der Säule hin.

C.3.2.1.3. Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex

Nachdem sich die Gelchromatographie der Fraktion 1.6 für die Abtrennung des Sextapeptides als unbrauchbar erwies, wurde eine Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex durchgeführt. Die Säule wurde mit einem pH-Gradienten von 3,5 - 6,5 entwickelt, wobei sich eine vollständige Abtrennung des Peptids T2 ergab. Die Peptide T1 und T3 wurden wiederum in einer Fraktion im äquimolaren Verhältnis eluiert.

Das Elutionsprofil dieses Chromatographieschrittes ist wegen seiner geringen Aussagekraft nicht abgebildet.

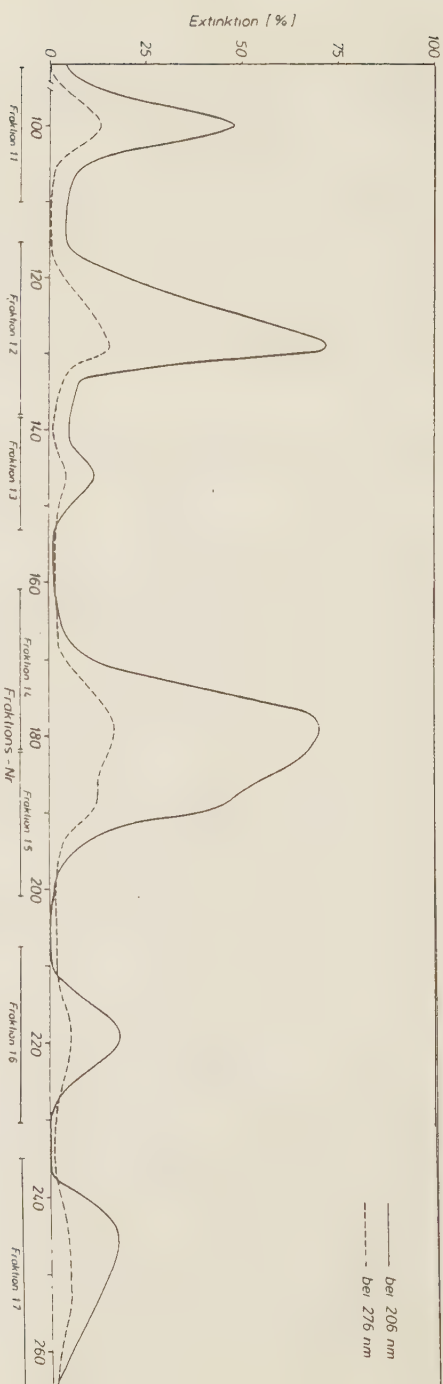


Abb. 21 Auftrennung der tryptischen Peptide an Biogel P30 (s. D.3.4.4.1.)

— Extinktion bei 206 nm
- - - Extinktion bei 276 nm

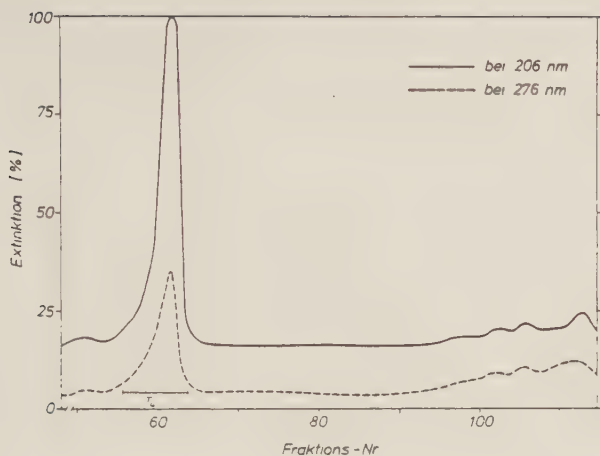


Abb.22 Rechromatographie der Fraktion 1.4 an Biogel P6
(s. D.3.4.4.2.)

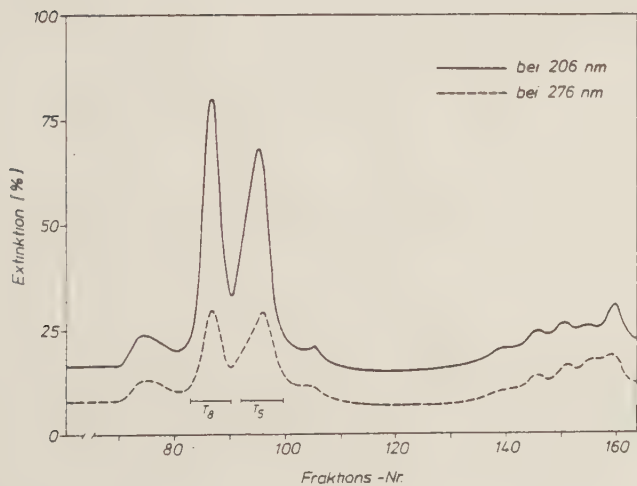


Abb.23 Rechromatographie der Fraktion 1.5 an Biogel P6
(s. D.3.4.4.2.)

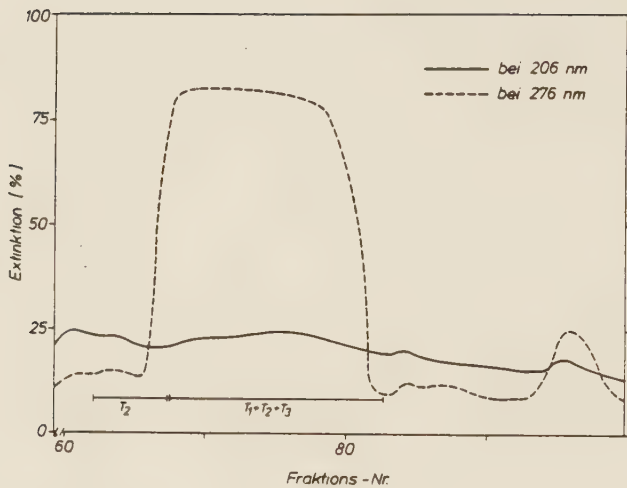


Abb.24 Rechromatographie der Fraktion 1.6 an Biogel P6 (s. D.3.4.4.2.)

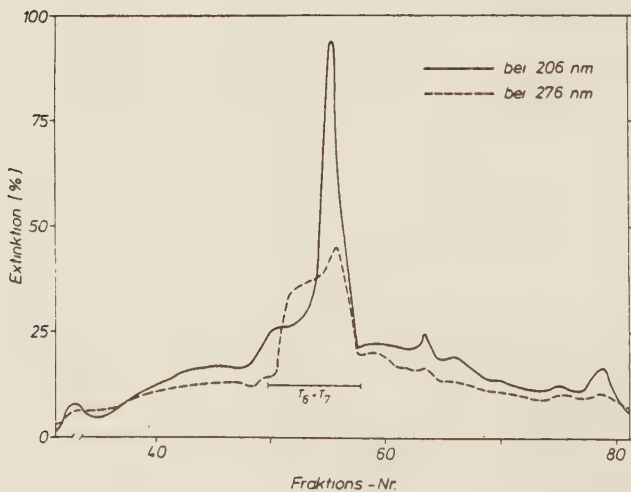


Abb.25 Rechromatographie der Fraktion 1.7 an Biogel P2 (s. D.3.4.4.4.)

Da die Sequenz der beiden Peptide T1 und T3 bereits bekannt war und nur zur Bestätigung der N-terminalen Teilsequenz (s. Abb. 19) beitragen sollte, wurde von einer weiteren Reinigung abgesehen und ein Simultanabbau beider Peptide zur Sequenzbestimmung durchgeführt.

C.3.2.1.4. Rechromatographie an Biogel P2

Durch die Aminosäureanalyse und Endgruppenbestimmung wurde festgestellt, daß die Fraktion 1.7 des tryptischen Inkubationsansatzes aus einem Dipeptid (T6) und einem Tripeptid (T7) besteht. Es wurde ein vergeblicher Versuch unternommen, die beiden Peptide über eine Gelchromatographie an Biogel P2 zu trennen (Abb. 25). Die Chromatographie war aber insofern erfolgreich, als einige der eluierten Fraktionen einen Teil des Peptids T7 enthielten, der nur wenig verunreinigt war und für eine Endgruppenbestimmung und Aminosäureanalyse ausreichte. Als Ergebnis fand sich für das Peptid T7 die Sequenz Tyr-Asx-Arg-COOH.

Da sich die Fraktion 1.7 aus einem äquimolaren Gemisch der Peptide T6 und T7 zusammensetzte, resultiert aus der Kenntnis der Sequenz von Peptid T7 die Sequenz von Peptid T6 mit Val-Arg-COOH.

C.3.2.2. Bemerkungen zur Isolierung der tryptischen Peptide

In Tabelle 9 sind die Aminosäurezusammensetzungen, Endgruppen und die Positionen der tryptischen Peptide wiedergegeben.

C.3.2.3. C-terminale Sequenz von Peptid T8

Aus der tryptischen Spaltung resultierte ein einziges lysin- und argininfreies Peptid, so daß anzunehmen ist, daß es sich um das C-terminale Peptid handelt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde ein C-terminaler Abbau mit Carboxypeptidase Y unter identischen Bedingungen wie für natives Eglin c durchgeführt. Das Er-

Tabelle 9 Tryptische Peptide, Aminosurezusammensetzung, N-terminale Endgruppe, Position, Ausbeute

Amino- säure	natives Eglin c	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
Asp	6,76 (7)	0,82 (1)		1,01 (1)	2,04 (2)	1,08 (1)		1,02 (1)	2,98 (3)
Thr	4,52 (5)	0,90 (1)		0,81 (1)	1,81 (2)	0,89 (1)			0,94 (1)
Ser	2,92 (3)	0,87 (1)		0,94 (1)	0,94 (1)	0,81 (1)			
Glu	7,16 (7)	1,75 (2)		0,87 (1)	2,09 (3)	1,16 (1)			
Pro	5,9 (6)	0,91 (1)		0,91 (1)	3,08 (3)	1,72 (2)			2,04 (2)
GLY	5,18 (5)	0,96 (1)	1,00 (1)		1,19 (1)	1,06 (1)			2,0 (2)
Ala	1,16 (1)			0,96 (1)					
Cys	-								
Val	10,78 ^b (11)		1,87 ^b (12)	1,15 (1)	2,07 (2)	1,11 (1)	0,98 (1)		4,79 ^b (5)
Met	-								
Ile	4,74 (5)	0,77 (1)			3,41 (3-4)	2,47 (2-3)			
Leu	5,12 (5-6)				3,19 (3-4)				
Tyr	4,93 (5)	0,99 (1)	0,87 (1)		1,81 (2)	0,35 (1)		0,75 (1)	0,93 (1)
Phe	2,98 (3)				1,09 (1)				1,04 (1)
His	2,18 (2)	0,90 (1)	0,98 (1)		0,86 (1)	0,98 (1)	0,99 (1)	0,87 (1)	1,78 (2)
Lys	3,80 (4)			0,93 (1)					
Arg									
Total	70	8	8	6	26	13	2	3	17
N-terminale Aminosäure	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Phe	Val	Tyr	Val
Sequenz- position		1-8	9-16	17-22	23-48	36-48			
Ausbeuten nach Rein- darstellung		280 nmol	390 nmol	280 nmol	240 nmol	230 nmol	750 nmol		516 nmol

^a molares Verhältnis der Aminosäure nach 20h Hydrolyse in 5,7N HCl
^b und nach 72h Hydrolyse

Tabelle 10 Bestimmung der C-terminalen Sequenz von Peptid T₈

Zur Hydrolyse mit Carboxypeptidase Y eingesetzte Menge Peptid	7,9 nMol
Freigesetzte Aminosäuren in der Reihenfolge ihres Erscheinens	Gly 7,4 nMol Val 9,7 nMol
Andere Aminosäuren	Asp Thr Ser <1,3 nMol Leu Tyr
C-terminale Sequenz	...Val....Val-Gly-COOH

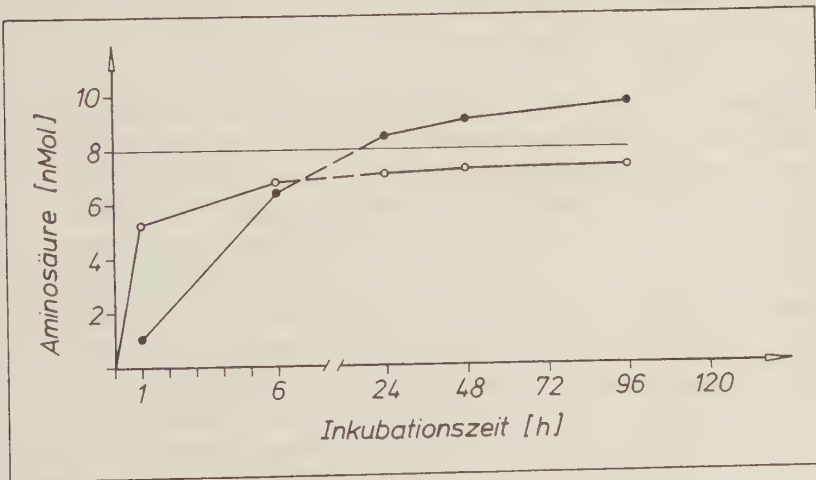


Abb.26 Bestimmung der C-terminalen Aminosäure von Peptid T₈ (s. D.3.3.4.)

○—○ freigesetztes Glycin
●—● freigesetztes Valin

gebnis (Tab.10 und Abb.26) stimmt sowohl hinsichtlich der Sequenz der Aminosäuren als auch hinsichtlich des kinetischen Ablaufes der Freisetzung der Aminosäuren mit der Analyse des nativen Eglins überein (vg. Tab.5 und Abb.15, C.2.2.2.).

C.3.2.4. Sequenz der tryptischen Peptide

Alle Peptide wurden nach den angegebenen Bedingungen (s. D.3.4.4.), allerdings unter Zusatz von Polybren (93), sequenziert. Dieser polykationische Träger verhindert ein Auswaschen der kleinen Peptide im Sequenzercup nach jedem Abbauschnitt und ermöglicht eine Sequenzierung bis zur letzten Aminosäure.

Die Sequenz der folgenden Peptide aus der tryptischen Spaltung wurde ermittelt: T_2, T_4, T_5, T_8 und $T_1 + T_3$ in einem Simultanabbau. Das qualitative und quantitative Ergebnis ist in den Tabellen 11a-e wiedergegeben. Aus dieser Information konnte die Sequenz des Eglins eindeutig erstellt werden, mit Ausnahme der Positionen 49-53.

Die Zuordnung der Peptide $T_1 - T_5$ erwies sich als problemlos infolge Kenntnis der N-terminalen Teilsequenz, die aus den Sequenzierungsläufen des nativen Eglins gewonnen wurde. Peptid T_8 konnte durch Abbau mit Carboxypeptidase Y als das C-terminale Peptid identifiziert werden (s. C.3.2.3.). Dagegen war die Zuordnung der Peptide T_6 (Val-Arg) und T_7 (Tyr-Asx-Arg) nicht möglich, da kein Überlappungspeptid mit dieser Sequenzfolge aus der tryptischen Spaltung resultierte. Man kann aber annehmen, gestützt durch die Aminosäureanalyse und die bekannten Sequenzen der tryptischen Peptide und des nativen Eglins, daß die beiden Peptide T_6 und T_7 die Positionen 49-53 einnehmen. Allerdings kann keine Aussage darüber gemacht werden, in welcher Reihenfolge die Peptide dort angeordnet sind. Dies kann nur durch die Gewinnung eines Überlappungspeptides für diese fraglichen Positionen geklärt werden.

Tabelle 11 Ergebnis der Sequenzierungsläufe der tryptischen Peptide

Alle Peptide wurden im Quadrolprogramm (0,25 M) unter Zusatz von 3 mg Polybren sequenziert (siehe auch D.3.4.5).

a) Sequenzerlauf Peptid T₁+T₃, je 250 nMol eingesetzt

Schritt	Nachweis- methode	Aminosäure Peptid T ₁	Ausbeute nMol	Aminosäure Peptid T ₃	Ausbeute nMol
1	Dc,Gc	Thr	111	Thr	
2	Dc,Gc	Glu	31	Val	103
3	Dc,Gc	Phe	81	Asn	92
4	Dc,Gc	Gly	57	Gln	52
5	Dc,Gc	Ser	11	Ala	66
6	Dc,Gc	Glu	85	Arg	
7	Dc,Gc	Leu	27		
8	Dc	Lys			

Dc: Dünnschichtchromatographie
Gc: Gaschromatographie
Rh: Rückhydrolyse

b) Sequenzerlauf Peptid T₂, 240 nMol eingesetzt

Schritt	Aminosäure Peptid T ₂	Nachweis- methode	Ausbeute nMol
1	Ser	Dc, Gc	42
2	Phe	Dc, Gc	140
3	Pro	Dc, Gc	76
4	Glu	Dc, Gc	94
5	Val	Dc, Gc	110
6	Val	Dc, Gc	107
7	Gly	Dc, Gc	55
8	Lys	Rh	37

c) Sequenzerlauf Peptid T₄, 140 nMol eingesetzt

Schritt	Aminosäure Peptid T ₄	Nachweis- methode	Ausbeute nMol
1	Glu	Dc, Gc	35
2	Tyr	Dc, Gc	42
3	Phe	Dc, Gc	48
4	Thr	Dc, Gc	48
5	Leu	Dc, Gc	37
6	His	Dc, Rh	37
7	Tyr	Dc, Gc	27
8	Pro	Dc, Gc, Rh	35
9	Gln	Dc, Gc, Rh	30
10	Tyr	Dc, Gc	8
11	Asn	Dc, Gc, Rh	21
12	Val	Dc, Gc	40
13	Tyr	Dc, Gc	21
14	Phe	Dc, Gc	19
15	Leu	Dc, Gc	20
16	Pro	Dc, Gc	9
17	Glu	Dc, Gc	7
18	Gly	Dc, Gc	7

d) Sequenzerlauf Peptid T₅, 230 nMol eingesetzt

Schritt	Aminosäure Peptid T ₅	Nachweis- methode	Ausbeute nMol
1	Phe	Dc,Gc	60
2	Leu	Dc,Gc	76
3	Pro	Dc,Gc	45
4	Glu	Dc,Gc	47
5	Gly	Dc,Gc	57
6	Ser	Dc,Gc	59
7	Pro	Dc,Gc	47
8	Val	Dc,Gc	66
9	Thr	Dc,Gc,Rh	77
10	Leu	Dc,Gc,Rh	54
11	Asn	Dc,Gc,Rh	47
12	Leu	Dc,Gc,Rh	47
13	Arg	Dc, Rh	14

e) Sequenzerlauf Peptid T₈, 300 nMol eingesetzt

Schritt	Aminosäure Peptid T ₈	Nachweis- methode	Ausbeute nMol
1	Val	Dc,Gc	174
2	Phe	Dc,Gc	137
3	Tyr	Dc,Gc	142
4	Asn	Dc,Gc	
5	Pro	Dc,Gc	132
6	Gly	Dc,Gc	114
7	Thr	Dc,Gc	145
8	Asn	Dc,Gc	
9	Val	Dc,Gc	132
10	Val	Dc,Gc	124
11	Asn	Dc,Rh	
12	His	Dc,Rh	
13	Val	Dc,Gc	108
14	Pro	Dc,Dc	48
15	His	Dc,Rh	
16	Val	Dc,Gc	37
17	Gly	Dc,Gc	12

C.3.2.5. Bemerkungen zur Sequenz

Die tryptische Spaltung wurde mit Schweinepankreas-Trypsin durchgeführt, das mit TPCK vorbehandelt war (94,95), um eventuell vorhandene chymotryptische Aktivität zu inhibieren. Trotzdem wurde aus dem tryptischen Inkubationsansatz ein Peptid (T5) isoliert, das durch Spaltung der Tyr-Phe-Bindung in Position 35-36 entstanden ist. Dies ist die einzige Spaltung, die auf eine chymotryptische Aktivität zurückzuführen ist. Die Vermutung, daß es sich bei dieser Peptidbindung um das reaktive Zentrum handelt, das bei der Inkubation mit Trypsin "modifiziert" wurde, konnte bislang nicht bestätigt werden.

Die Abbildung 27 zeigt die vollständige Sequenz von Eglin c, wobei die Reihenfolge des Di- und Tripeptids T6 und T7 in Position 49-53 noch zu klären ist.

Eine auffällige Sequenzfolge liegt in den Positionen 48-53 vor, die 3 der 4 Argininreste auf sich vereinigen und damit diesem Teil des Moleküls einen ausgeprägt positiven Ladungscharakter verleihen.

Es wurden weiterhin Versuche unternommen, durch enzymatische Hydrolyse ein Überlappungspeptid für die Positionen 48-55 zu erhalten. Theoretisch bietet sich als beste Möglichkeit die Spaltung mit der Proteinase aus *Staphylococcus aureus* an (96). Dieses Enzym spaltet spezifisch an den Carboxylenden der sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure. Durch gezielte Pufferwahl (0,05 M NH_4Ac , pH 4,0) kann die Hydrolyse auf Glutaminsäurebindungen beschränkt werden (97).

Eglin weist in Position 39 den letzten Glutaminsäurerest auf; aus der Hydrolyse mit der Proteinase aus *Staphylococcus aureus* sollte demnach ein Peptid hervorgehen, das die Positionen 39-70 umfaßt. Mehrmalige Ansätze unter variierten Bedingungen, z.B. Inkubationszeiten bis zu 5 Tagen oder Zusatz von 10 Mol% Enzym, blieben erfolglos.

Hydrolysen mit Thermolysin und Subtilisin, beides Proteinasen mit breiter Spaltungsspezifität, sind geplant. Dabei soll versucht

werden, durch kurze Inkubationszeiten und Bedingungen, die die native Struktur des Eglins bewahren, die Proteolyse zu limitieren. Derartige Spaltungen wurden erfolgreich mit Subtilisin für Ribonuklease (98) und Phosphorylase durchgeführt (99,100).

C.4. Untersuchungen zum Hemmechanismus

Da sich die Egline in ihrer Struktur von den meisten bekannten Protein-Proteinase-Inhibitoren signifikant unterscheiden, drängt sich die Frage auf, ob denn der in der Einleitung beschriebene Hemmechanismus auch für die Egline zutrifft. Zur Klärung dieses Problems wurden Inkubationsversuche von Eglin c mit Trypsin und Chymotrypsin unternommen.

C.4.1. Inkubation mit Trypsin

Eglin c wurde mit 2 und 50 Mol% Trypsin (TPCK-behandelt) bei pH 7,8 und pH 3,0 inkubiert; die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden an Hand der Hemmaktivitätsmessung gegen Chymotrypsin verfolgt.

Die Versuche führten zu folgendem Ergebnis: Während im sauren Medium keine Hemmaktivitätsabnahme eintrat, war bei pH 7,8 schon nach einigen Stunden, auch bei Inkubation mit 2 Mol% Trypsin, ein starker Hemmaktivitätsverlust zu beobachten (s.a. C.3.2.). Offenbar wird Eglin im pH-Optimum des Trypsins proteolytisch abgebaut; die ohnehin schwache Hemmaktivität der Egline gegenüber Trypsin ist deshalb als eine temporäre Hemmung zu bezeichnen.

Die Resistenz im Sauren ist auf die eingeschränkte Aktivität des Trypsins bei diesem pH zurückzuführen.

C.4.2. Inkubation mit Chymotrypsin

Es wurden entsprechende Versuche mit Chymotrypsin durchgeführt, das von den Eglinen stark gehemmt wird.

Eglin c wurde mit 5, 50 und 90 Mol% Chymotrypsin bei pH 7,8 und pH 3,0 inkubiert; die Ansätze wurden nach 5 Minuten, 2, 24 und 48 Stunden auf ihre Hemmaktivität gegen Chymotrypsin untersucht (Tab.12). Ein aliquoter Teil jedes Ansatzes wurde ohne vorherige Reduktion in der SDS-Elektrophorese aufgetrennt (Abb.28). Aus den Versuchsergebnissen läßt sich folgern:

1. Die Reaktion der Egline mit Chymotrypsin führt zur Bildung eines stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexes, der in der SDS-Elektrophorese nicht dissoziierbar ist.

2. Die Reaktion ist mit einer limitierten Proteolyse verbunden, die die Abspaltung eines Peptids vom Eglin zur Folge hat.

Komplexbildung und limitierte Proteolyse verlaufen im Inkubationsansatz bei pH 7,8 und auch bei pH 3,0.

3. Es ist eine Abnahme der Hemmaktivität in den Inkubationsansätzen in Abhängigkeit vom pH, der Inkubationszeit und dem molaren Enzym-Inhibitor-Verhältnis zu beobachten.

Die Hemmaktivität des Inkubationsansatzes bei pH 7,8 mit 5 Mol% Chymotrypsin ist über 48 Stunden konstant; ein geringer Aktivitätsverlust ist bei Inkubation mit 50 Mol% Enzym nach 48 Stunden und bei Inkubation mit 90 Mol% schon nach 2 Stunden festzustellen.

Die Aktivitätsverluste im sauren Inkubationsansatz treten ausgeprägter und nach kürzeren Inkubationszeiten auf. So ist bereits im 5 Mol%-Ansatz nach 48 Stunden eine Hemmaktivitätsabnahme meßbar, im 50 Mol%-Ansatz und im 90 Mol%-Ansatz ist diese Abnahme schon nach 2 Stunden deutlich sichtbar.

Die Abnahme der Hemmaktivität in den Inkubationsansätzen verläuft parallel mit der Zunahme der niedermolekularen Bande in der SDS-Elektrophorese.

Tabelle 12 Inkubation von Eglin c mit Chymotrypsin

Eglin c wurde mit 5,50 und 90 Mol% Chymotrypsin bei pH 3,0 und 7,8 inkubiert. Die Änderung der Hemmaktivität in den Ansätzen wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt (s.a. C.4.2.).

	5 Mol% Chymotrypsin [mIU/Ansatz]	50 Mol% Chymotrypsin [mIU/Ansatz]	90 Mol% Chymotrypsin [mIU/Ansatz]
Inkubations- zeit	Inkubation bei pH 3,0	Inkubation bei pH 3,0	Inkubation bei pH 3,0

° freie Enzymaktivität im Inkubationsansatz

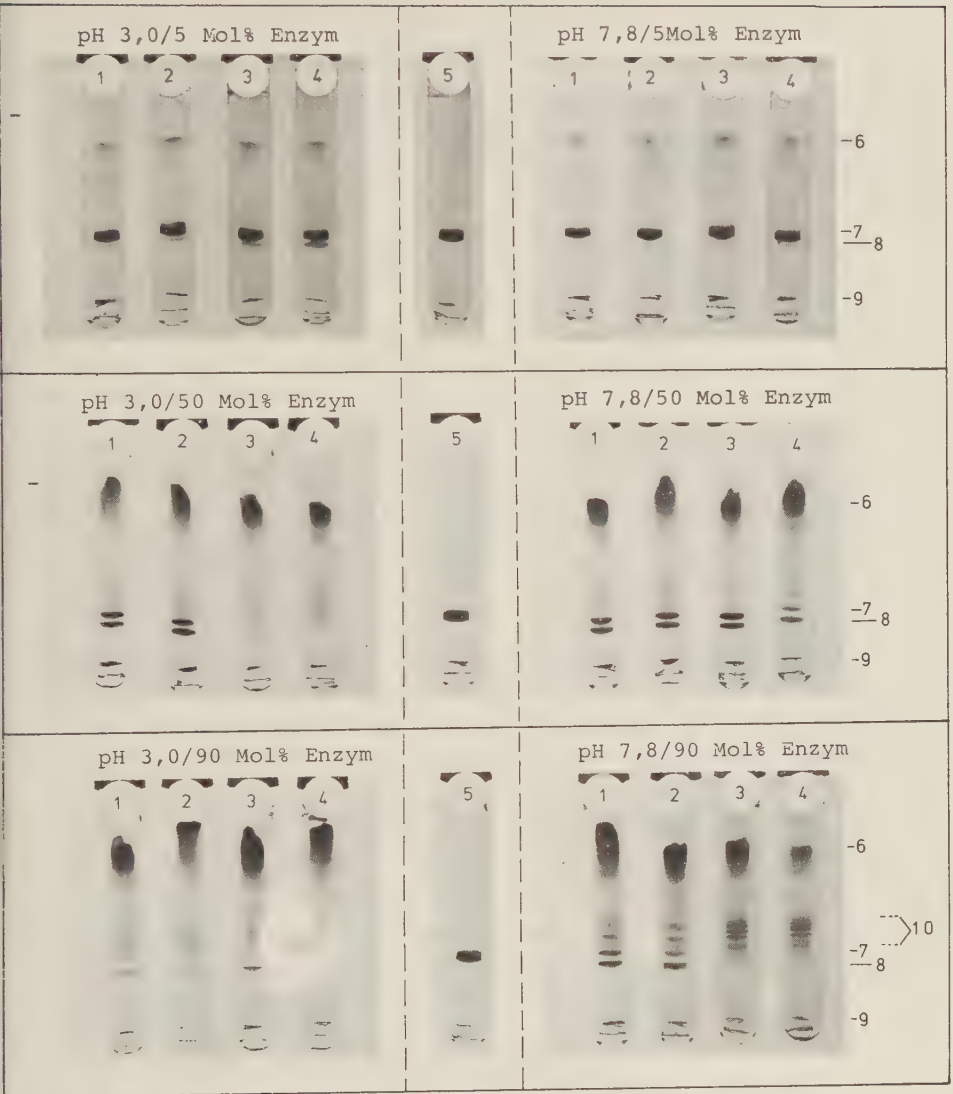


Abb.28 SDS-elektrophoretische Auftrennung des Inkubationsansatzes von Eglin c mit 5,50 und 90 Mol% Chymotrypsin bei pH 3,0 und 7,8. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten und 2,24 sowie 48 Stunden (s.a.Tabelle 12 und C.4.2.).

- | | |
|-------------------------|----------------------------------|
| 1 5 Minuten Inkubation | 6 Komplexbande |
| 2 2 Stunden Inkubation | 7 natives Eglin c |
| 3 24 Stunden Inkubation | 8 Eglinfragment |
| 4 48 Stunden Inkubation | 9 Marker zur Lauffrontmarkierung |
| 5 natives Eglin c | 10 Nebenbanden des Chymotrypsins |

Diese Versuchsergebnisse werden in der Diskussion interpretiert. An dieser Stelle sei nur darauf verwiesen, daß offensichtlich Unterschiede zu dem Reaktionsmechanismus der bekannten Serin-proteinase-Inhibitoren bestehen.

D. MATERIAL UND METHODEN

D.1. Apparate

Photometer

Für Enzymmessungen bei 405 nm und 366 nm: Eppendorf Photometer 1101 mit Kienzle Drucker 624.

Für Messungen bei anderen Wellenlängen: Zeiss Spektralphotometer PMQ3, ebenfalls mit Kienzle Drucker.

Säulenchromatographie

Die optische Dichte der Säulenuate wurde bei 256 bzw. 280 nm mit dem Durchflußphotometer Uvicord II der Firma LKB gemessen; es wurde automatisch mit dem Gilson Fraktionssammler fraktioniert. Die säulenchromatographische Trennung der Peptide zur Sequenzierung wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord III registriert und die Eluate mit einem Redirac Fraktionssammler der Firma LKB fraktioniert. Der Uvicord III bietet die Möglichkeit, bei 2 Wellenlängen, nämlich 206 und 276 nm, simultan zu messen und so auch kurzkettige Peptide zu registrieren.

Die Durchflußgeschwindigkeiten der Säulen wurden mit Perpex-Pumpen von LKB mit austauschbaren Getrieben reguliert.

Ultrafiltration

Amiconzelle 350 ml, UM 05-Membran

Elektrophoresen

Disk- und SDS-Elektrophoresen: Rundgel-Elektrophoresekammer von Shandon mit Glasröhrchen 7,5 x 4,5 mm, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB.

Isoelektrische Fokussierung: Flachgel-Elektrophorese-System Multiphor von LKB, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB.

Aminosäureanalysen

Durum D 500

Rückhydrolysierte PTH-Aminosäuren: Biotronik, Modell 4000.

Sequenzierung

Sequenator Modell 8900, Beckman Instruments, Gaschromatograph von Hewlett Packard, Modell 7620A mit Rechner zur quantitativen Auswertung von Hewlett Packard, Modell 3380A.

D.2. Substanzen

D.2.1. Enzyme

Rinderpankreas-Trypsin, TPCK-behandelt (Art.24581), Rinder-Chymotrypsin, TLCK-behandelt (Art.2308) und Schweinepankreas-Trypsin, 8,0 U/mg (Art.8350), alle Merck, Darmstadt.

Schweine-Plasmin: 3,2 NE/mg, batch 75-19, Novo Industri A/S, Mainz.

Subtilisin: Proteinase aus *Bacillus subtilis*, var. *biotecnus* A, 1000 E/mg (Art.82490), Fluka AG, Buchs

Elastase und Kathepsin G aus menschlichen Granulozyten isoliert nach Ohlsson, Olsson (101), bzw. Olsson, Venge und Odeberg (102,103).

Rinder-Thrombin: (Test-Thrombin, 30 IU/tube), Behringwerke, Marburg.

Schweinepankreas-Elastase: 80 E/mg (Art.24552), Merck, Darmstadt.

Schweinepankreas-Kallikrein: 1 180 KE/mg, Bayer AG, Wuppertal.
Menschliches Plasmakallikrein: isoliert nach Geiger (104).
Carboxypeptidase Y: (Art.20212) Pierce Chemical Company, USA
Protease aus Staphylococcus aureus: (Art.36900) Miles Laboratories, Ltd. U.K.
Thermolysin: (Art.36015) Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

D.2.2. Substrate

N^α-Benzoyl-L-arginin-äthylester (Art.1672), Merck, Darmstadt.
N^α-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid (Art.10754), Merck, Darmstadt.
N^α-Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid (Art.15070), Merck, Darmstadt.
N^α-Benzoyl-L-tyrosinäthylester (Art.13110), Fluka AG, Buchs.
Azo-casein (Art.11610), Fluka AG, Buchs.
N^α-Succinyl-(alanyl)₃-4-nitroanilid (Art.3071), Protein Research Foundation, Osaka, Japan.
N^α-Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginin-4-nitroanilid (Art.57651), Kabi Diagnostica, Stockholm, Schweden.
4-Guanidino-benzoesäure-4-nitrophenylester (Art.10562), Merck, Darmstadt.

D.2.3. Materialien für die Säulenchromatographie

Sephadex G-75 medium (Art.9065), Sephadex G-25 fine (Art.2123) und SP-Sephadex C-25 (Art.7127) Pharmacia, Uppsala, Schweden; DEAE-Cellulose DE52 (Art.24521), Whatman, Kent; Fractogel PGM 2000 (Art.9398), Merck Darmstadt; Biogel P30 (Art.150-1360), Biogel P6 (Art.1500750) und Biogel P2 (Art.150-0150), Bio-Rad Laboratories, Richmond.

D.2.4. Materialien für die Polyacrylamid-Elektrophorese

Acrylamid (Art.10675), N,N'-Methylenbisacrylamid (Art. 29195), Serva, Heidelberg; N,N,N',N'-Tetramethylenäthylendiamin (Art.808742), Merck-Schuchardt; Dithiothreitol (Art.161-0611), Bio-Rad Laboratories, Richmond; Natriumdodecylsulfat (Art. 1610300), Bio-Rad Laboratories, Richmond; Coomassie Brilliant Blue R-250 (Art.17525), Serva, Heidelberg; Ampholine

D.2.5. Materialien für die Sequenzierung

Phenylsenföhl (Art.26921), Heptafluorbuttersäure (Art.25003), Polybrene (Art.25008), Quadrolpuffer (Art.25000) und Citraconsäureanhydrid (Art.20907), alle Pierce, Rockford, Ill.

D.2.6. Andere Materialien

2-Mercaptoäthanol (Art.28625) und Fluram (Art.21551), Serva, Heidelberg; Jodessigsäure (Art.374), Merck, Darmstadt; 1-Dimethylaminonaphthyl-5-sulfochlorid (Art.39220), Fluka AG, Buchs; Micro-Polyamid-Platten F 1700 (Art.356 000), Schleicher und Schüll, Dassel; HPTLC-Platten (Art.5641), Merck, Darmstadt.

Der Blutegelrohextrakt (Hirudin 100 ATE/mg) wurde uns von der Firma Plantorgan, Bad Zwischenahn, zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Substanzen waren vom höchsten, im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

D.3. Methoden

D.3.1. Enzym- und Hemmtests

Die Enzym- und Hemmaktivitätsmessungen erfolgten nach den bekannten Methoden, die in Tabelle 13 übersichtsweise zusammengefasst sind.

Es handelt sich um photometrische Bestimmungen. Dabei wird die Freisetzung adsorbierender Moleküle aus synthetischen Substraten an Hand der Extinktionsänderung bei entsprechenden Wellenlängen verfolgt (z.B. p-Nitroanilin bei 405 nm). Die Hydrolyse von 1 μ Mol Substrat pro Minute bei 25°C (bzw. 30°C für Subtilisin) entspricht dabei 1 Enzymeinheit (U). Die Hemmung einer Enzymeinheit entspricht 1 Inhibitoreinheit (IU). Die Hemmaktivitätsmessung erfolgt nach Inkubation des Enzyms mit dem Inhibitor in dem entsprechenden Puffer für 5 Minuten, bevor die Substratlösung zugegeben wird.

Diese Enzym- bzw. Inhibitorbestimmungen sollen beispielhaft am Trypsin- und Kallikreintest dargestellt werden.

Trypsin

0,1 ml Trypsinlösung (10 mg/100 ml in 0,0025 N HCl), (1,9 - x) ml TRA-Puffer (0,2 M, pH 7,8) und x ml Inhibitorlösung werden 5 Minuten inkubiert (25°C) und die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml L-BAPA-Lösung (50 mg/100 ml dest. H₂O) gestartet. Die Substrathydrolyse (Freisetzung von p-Nitroanilin) wird durch Messung der Extinktionsänderung pro Minute bei 405 nm verfolgt. Die Extinktionsänderung von 0,00332 pro Minute entspricht einer Enzymaktivität von 1 mU. Die Verminderung der Extinktionsänderung von 0,0032 pro Minute entspricht einer Inhibitoraktivität von 1 mIU. Entsprechend dem Trypsintest werden die Bestimmungen für Chymotrypsin, Plasmin, Elastase, Kathepsin G, Thrombin und Akrosin durchgeführt. Dagegen erfolgt die Bestimmung des Subtilisins als Endpunktmessung und nicht als kontinuierliche kinetische Messung.

Tabelle 13

Testsysteme zur Messung der Enzymaktivitäten

Enzym	EK°/ Ansatz	Substrat	SK° [mg/Ansatz]	E° [nm]	Puffer	Lit.
Trypsin ^a Plasmin ^c Akrasin ^e	10 µg	BzArgNHNP	0,5	405	0,2M TRA/HCl, pH 7,8	105
Chymotrypsin ^a	20 µg	BzTyrOEt SucPheNHNP	0,235 2,5	256 405	0,1M Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 7,4 0,2M TRA/HCl, 0,02M CaCl ₂ , pH 7,8	106 105
Elastase ^b	10 µg	Suc(Ala) ₃ NHNP	1,35	405	0,2M TRA/HCl, pH 7,8	107
Kathepsin ^b G ^b	11 µg	BzTyrOEt	0,235	256	0,1M Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 7,4	106
Subtilisin ^f	5 µg	Azocasein	40	366	0,1M Na ₂ HPO ₄ , 0,02M KH ₂ PO ₄ pH 7,6	105
Thrombin ^a	0,02 IU	BzPheValArgNHNP	0,054	405	0,05M TRIS, 0,05M Imidazol, 0,15M NaCl, pH 8,3	108
Pankreas- Kallikrein ^a		BzArgOEt/ADH	0,51/0,60	366	0,075M Na ₄ P ₂ O ₇ , 0,07M Semi- carbazid/HCl, 0,0225M Gly- cin, pH 8,7	105

^a aus Rinderpankreas
^b aus menschlichen PMN-Granulozyten
^c vom Schwein

^d vom Rind
^e vom Menschen
^f Temperatur: 30°C

° EK: Enzymkonzentration ° SK: Substratkonzentration

° E: Extinktionsmessung bei

Kallikrein

2,4 ml Pyrophosphatpuffer (75 mM Natriumpyrophosphat/75 mM Semi-carbazid/22,5 mM Glycin, pH 8,7), 0,2 ml BAEE-Lösung (7,5 mM), 0,1 ml NAD-Lösung (30 mM) und (0,18-x)ml destilliertes Wasser werden gemischt, mit 0,02 ml ADH-Suspension (30 mg/ml) versetzt und 5 Minuten stengelassen. Diese Mischung wird mit einem vorinkubierten Ansatz (5 Minuten) aus 0,1 ml Kallikreinlösung (= 25 mU) und x ml Inhibitorlösung versetzt. Die Extinktion pro Minute wird bei 366 nm und 25°C verfolgt. Die Extinktionsänderung von 0,001147 entspricht einer Enzymaktivität von 1 mU. Die Verminderung der Extinktionsänderung von 0,001147 entspricht einer Inhibitoraktivität von 1 mIU.

D.3.2. Isolierung der Egline

D.3.2.1. Gelchromatographie an Sephadex G-75 (s. Abb.8)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 3,8 x 150 cm, Matrix: Sephadex G-75 medium, Elutionspuffer: 0,05 M TRA HCl/0,4 M NaCl, pH 7,8, Durchflußgeschwindigkeit: 52 ml/h, Fraktionsvolumen: 9,7 ml, Probe: 1,5 g Blutegelrohextrakt, gelöst in 15 ml Elutionspuffer.

D.3.2.2. Anionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex (s. Abb.9)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1,5 x 80 cm, Matrix: DEAE-Cellulose Whatman, Elutionspuffer: 0,03 M NH_4Ac , pH 6,5, Durchflußgeschwindigkeit: 17 ml/h, Fraktionsvolumen: 3,7 ml, Probe: 70 mg Fraktion II (von der gelchromatographischen Trennung), gelöst in 1 ml Elutionspuffer. Das pH wird, wenn erforderlich, auf 6,5 eingestellt. Die Säule wird mit dem Elutionspuffer entwickelt, bis der größte Teil der chymotryptischen Hemmaktivität mit der Fraktion IIb,c eluiert ist. Dann wird ein linearer Salzgradient aus je 300 ml Elutionspuffer und 0,06 M NH_4Ac /0,4 M NaCl, pH 6,5 angeschlossen.

D.3.2.3. Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex (s.Abb.10)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1,5 x 75 cm, Matrix: SP-Sephadex C-25, Elutionspuffer: 0.05 M NH_4Ac , pH 5,0, Durchflußgeschwindigkeit: 17 ml/h, Fraktionsvolumen: 3 ml, Probe: 50 mg Fraktion IIb,c (von der Anionenaustauschchromatographie), gelöst in 1 ml Elutionspuffer und auf pH 5,0 eingestellt. Die Säule wird 6 Stunden lang mit dem Elutionspuffer, anschließend mit einem Salzgradienten aus je 300 ml 0,05 M NH_4Ac , pH 5,0 und 0,05 M NH_4Ac /0,5 M NaCl, pH 5,0 entwickelt.

D.3.3. Reinheitsprüfungen und Charakterisierung der Eglone

D.3.3.1. Elektrophoresen

Sämtliche Rundgel-Elektrophoresen wurden in einer Shandon-Disk-Elektrophoresekammer mit 4,5 x 75 mm Glasröhrchen ausgeführt. Die Probenmenge für alle elektrophoretischen Trennungen betrug 10 - 15 μg .

Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue nach (109), entfärbt wurde mit Methanol/Eisessig/Wasser (50:75:875, v/v/v).

D.3.3.1.1. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophoresen wurden in 10% Polyacrylamidgelen bei pH 4,3 und pH 8,9 durchgeführt. Die Gelsysteme entsprechen mit geringen Änderungen den Gelsystemen 2 bzw. 8 nach Maurer (110).

Die Trennung erfolgte bei 4°C, die Stromstärke lag bei 5 mA/Röhrchen, ein Lauf dauerte zwischen 60 - 100 min. Als Marker wurde Methylgrün bei pH 4,3 und Bromphenolblau bei pH 8,9 eingesetzt, die Markerfront wurde mit Chinatusche fixiert.

D.3.3.1.2. SDS-Elektrophorese

Die SDS-Elektrophorese erfolgte in 15% Polyacrylamidgelen mit 0,1% SDS, 0,01% TEMED in 1,5 M TRIS/HCl-Puffer, pH 8,8 (111). Als Marker wurde Bromphenolblau verwendet. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Referenzproteine eingesetzt: Chymotrypsinogen, Ribonuklease, Trasylol und Insulin.

D.3.3.1.3. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einem 5% Flachgel in einem Multiphor-Elektrophoresegerät von LKB nach der von LKB ausgearbeiteten Methode (112). Es wurde Ampholyte von LKB, die sog. Ampholine für den pH-Bereich 3,5 - 8, verwendet. Die Probenauftragung, Spannungsregelung und Zeitdauer der Elektrophoresen wurden entsprechend den Vorschriften von LKB gewählt. Es wurden je 19 µg Eglin b bzw. Eglin c aufgetragen, die Spannung betrug 270 V für 2,5 Stunden und zur Nachfokussierung 600 V für 0,5 Stunden. Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung wurde der pH-Gradient durch direkte Messung auf der Geloberfläche mit einer Oberflächen-pH-Elektrode erstellt. Aus der Position der durch Anfärbung sichtbar gemachten Proteinbande kann der isoelektrische Punkt der Proben an Hand der pH-Gradientenkurve ermittelt werden (Abb.14). Die erfolgreiche Fokussierung wurde mit folgenden Markerproteinen kontrolliert: Ferritin (IP 4,4), β -Lactoglobulin (IP 5,3), Rinder-serumalbumin (IP 4,7) und Myoglobin (IP 7,3).

D.3.3.2. Aminosäureanalysen

Die Proteinproben wurden in 6N Salzsäure bei 110°C für 20,40 und 72 Stunden unter Vakuum hydrolysiert. Die Aminosäureanalysen wurden am Durrum D500 Analyser durchgeführt (113). Der Gehalt an Cystein, Cystin und Methionin wurde nach Perameisensäurereoxydation (114), der Gehalt an Tryptophan photometrisch (115) bestimmt.

D.3.3.3. Reduktion und Carboxymethylierung

1,2 mg Eglin' b bzw. Eglin c wurden mit Mercaptoäthanol reduziert und mit Jodessigsäure (in Petrolbenzin, Siedebereich 40 - 60°C, umkristallisiert) carboxymethyliert (84). Der Inkubationsansatz wurde mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 in 0,1 M Essigsäure entsalzt. Natives und reduziertes-carboxymethyliertes Eglin wurden hinsichtlich ihrer Hemmaktivität und elektrophoretischen Eigenschaften verglichen.

D.3.3.4. Endgruppenbestimmung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure erfolgte nach Dansylierung und anschließender dünnschichtchromatographischer Identifizierung (78). Es wurden folgende Laufmittel verwendet:

Laufmittel I: 1,5% Ameisensäure; Laufmittel II: Benzol/Eisessig 5:1 v/v; Laufmittel III: Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig 20:1:1 v/v/v; Laufmittel IV (zur besseren Trennung von Glu): Essigsäurebutylester/Methanol/Eisessig 30:20:1 v/v/v.

Die C-terminale Sequenz wurde durch enzymatische Hydrolyse mit Carboxypeptidase Y bestimmt (79). 271 µg Eglin b bzw. 245 µg Eglin c wurden in 300 µl Puffer (0,05 M Pyridinacetat/0,5% SDS, pH 6,0) gelöst, dem Norleucin als interner Standard zugesetzt war. Es wurden 10 µl dieser Mischung zur Konzentrationsbestimmung mittels Aminosäureanalyse und 40 µl als Nullzeitkontrolle bzw. Blindwert entnommen. Zur Hydrolyse wurde dem Ansatz Carboxypeptidase Y im Molverhältnis 1:500 (Carboxypeptidase Y/Eglin) zugesetzt und bei 25°C inkubiert. Nach 5,60,360 Minuten, 24,48 und 120 Stunden wurden dem Reaktionsgemisch je 40 µl entnommen und die Hydrolyse durch Zusatz von 5 µl Trifluoressigsäure gestoppt. Nach Zentrifugation und Trocknung der Überstände wurden die freien Aminosäuren durch Aminosäureanalyse bestimmt. Die quantitative Auswertung erfolgte über Norleucin als internem Standard.

Unter identischen Bedingungen wurde die Bestimmung für Peptid T_8 (48 nMol im Ansatz) durchgeführt.

D.3.3.5. Hemmkurven und Inhibitorkonstanten

Die Hemmkurven wurden nach Green und Work (85) erstellt. Dazu wurde eine konstante Menge Enzym mit steigenden Mengen Inhibitor inkubiert und die verbleibende Enzymaktivität gemessen. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde Trypsin mit Nitrophenylguanidinobenzoat (116), Chymotrypsin und Kathepsin G mit 5-Nitro-2-Hydroxytoluolsulfonsäuresulten titriert (117).

D.3.3.6. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach Lowry bestimmt (118). Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin.

D.3.4. Sequenz

D.3.4.1. Dünnschichtchromatographische Peptiddetektion

Peptidaliquote (0,1 - 1 nMol) wurden in geringem Volumen (ca. 5 μ l) auf eine HPTLC-Platte (Merck) aufgetragen und in einem Fließmittel (Methanol/Chloroform/25% Ammoniak 40:40:20) getrennt. Nach dem Trocknen bei 110°C im Trockenschrank für 30 Minuten wird die abgekühlte Platte mit einer Fluramlösung (8,25 mg Fluram in 250 ml Aceton) bestrichen. Nach dem Verdunsten des Acetons sind die Peptide unter dem UV-Licht bei 365 nm sichtbar.

D.3.4.2. Citraconylierung

17,7 mg Eglin c (= 2,18 μ Mol) wurden in 3 ml 0,2 M Natriumboratlösung, pH 9.0 gelöst und portionsweise mit 1,5 ml Citraconsäureanhydrid (0,5 ml in 10 ml Dioxan) unter Konstanthaltung des pH-Wertes mit 5N Natronlauge versetzt.

Es wird ein 100facher molarer Überschuß an Reagenz zur Blockierung der freien Aminogruppen eingesetzt.

D.3.4.3. Tryptische Spaltung

Der citraconylierte Ansatz wurde auf pH 8,0 umgestellt, mit CaCl_2 (0,01 M) versetzt und mit 1 mg TPCK-behandeltem Trypsin (2 Mol%) für 6 bzw. 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das pH der Lösung auf 2,5 gesenkt und dabei unter Rühren bei 4°C für 36 Stunden die Citraconyl-Schutzgruppen wieder abgespalten.

Tryptische Spaltung ohne Citraconylierung

11 mg Eglin c (= 1,4 μ Mol) wurden mit 700 μ g Schweinepankreas-Trypsin (TPCK-behandelt) in 1,4 ml 0,01 M CaCl_2 -Lösung, pH 8,1, 25°C, versetzt. Die Inkubation wurde nach 6 Stunden beendet und die Lösung am Rotationsverdampfer eingetrocknet. Zu diesem Zeitpunkt waren 64% des Inhibitors zu inaktiven Produkten gespalten worden, was an Hand der chymotryptischen Hemmaktivität gemessen wurde. Das Peptidgemisch wurde zur Auftrennung über eine Gelchromatographie in 50% Essigsäure gelöst.

D.3.4.4. Isolierung der tryptischen Peptide

D.3.4.4.1. Gelchromatographie an Biogel P30 (s.Abb.21)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,9 x 200 cm; Matrix: Biogel P30 (200 - 400 mesh); Elutionspuffer: 50% (v/v) Essigsäure; Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,45 ml; Probe: getrockneter, tryptischer Inkubationsansatz, gelöst in 200 µl 50% Essigsäure.

D.3.4.4.2. Gelchromatographie an Biogel P6 (s.Abb.22-24)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,6 x 200 cm; Matrix: Biogel P6 (200 - 400 mesh); Elutionspuffer: 50% Essigsäure; Durchflußgeschwindigkeit: 0,8 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,3 ml; Proben: Fraktion 1.4 (1.5 und 1.6) gelöst in 100 µl 50% Essigsäure; Fraktionsvolumen: 0,3 ml (Fraktion 1.4), Fraktionsvolumen: 0,25 ml (Fraktion 1.5), Fraktionsvolumen: 0,55 ml (Fraktion 1.6).

D.3.4.4.3. Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,6 x 50 cm; Matrix: SP-Sephadex C25; Elutionspuffer: 0,05 M NH_4Ac , pH 3,5; Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,5 ml; Probe: Fraktion $T_1+T_2+T_3$ gelöst in jeweils 100 µl 0,05 M NH_4Ac , pH 3,5.

Die Säule wurde mit einem pH-Gradienten, gesteuert über einen Gradientenmischer (Mixograd, Firma Gilson), entwickelt. Als Gradientenpuffer wurde 0.05 M NH_4Ac , pH 6,5 verwendet, der Gradient lief über 24 Stunden.

D.3.4.4.4. Gelchromatographie an Biogel P2 (s.Abb.25)

Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,6 x 150 cm; Matrix: Biogel P2 (200 - 400 mesh); Elutions-

puffer: 50% Essigsäure; Durchflußgeschwindigkeit: 0,6 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,45 ml; Probe: Fraktion 1.7, gelöst in 50 µl 50% Essigsäure.

D.3.4.5. Sequenzuntersuchungen

Alle Sequenzierungsläufe wurden mit Hilfe eines automatischen Sequenators, Modell 890C von Beckman durchgeführt. Die Abbauten erfolgten in 0,25 M Quadrolpuffer mit einem modifizierten Programm 030176; die "cleavage time" wurde verlängert, sodaß die Ausbeuten für Prolin, die normalerweise sehr niedrig liegen, erhöht wurden (119).

Alle Peptide und der dritte Lauf mit nativem Eglin (S_3) wurden unter Zusatz von 3 mg Polybren durchgeführt. Dadurch wird ein vorzeitiges Auswaschen der mehr hydrophilen kleinen Peptide verhindert und die Ausbeuten der sequentiellen Abbauschritte erhöht (93).

Die beim Abbau entstehenden Thiazolinone werden zu Phenylhydantoinen konvertiert (1N HCl, 80°C, 10 min) und mit Äthylacetat extrahiert. PTH-Arginin, PTH-Histidin und PTH-Cysteinsäure verbleiben in der sauren wässrigen Phase, während alle anderen Aminosäuren in die organische Phase übergehen. Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren erfolgt durch Dünnschichtchromatographie (120), Gaschromatographie (121) und zum Teil durch Rückhydrolyse zu den ursprünglichen Aminosäuren mit 57% Jodwasserstoffsäure (2 mal redestilliert) für 20 Stunden bei 127°C (122).

E. DISKUSSION

E.1. Zur Isolierung

Die Eglane wurden in drei säulenchromatographischen Schritten gereinigt: Eine Gelfiltration, die eine Abtrennung der hochmolekularen Begleitproteine ermöglichte und zwei Ionenaustauschchromatographien führten zu homogenen Proteinpräparationen. Neben diesen konventionellen Isolierungsmethoden wurden auch affinitätschromatographische Verfahren an immobilisierten Enzymen (123,124) in Erwägung gezogen. Dieses Verfahren basiert auf der reversiblen Komplexbildung zwischen Proteinase-Inhibitor und Proteinase. In neutraler Lösung werden die entsprechenden Inhibitoren an das Enzymharz gebunden und können nach Auswaschen aller ungebundenen Substanzen unter dissoziationsfördernden Bedingungen (z.B. bei pH 2,0) wieder abgelöst werden.

Es wurden Versuche mit der Inhibitorfraktion II (aus der Gelchromatographie, s. C.1.1.) und Trypsin- bzw. Chymotrypsinharz durchgeführt. Die dahinterstehende Überlegung war, durch aufeinanderfolgende Behandlung des multiplen Inhibitorgemisches (Hemmaktivität gegen Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase und Kathepsin G) mit verschiedenen Enzymharzen die jeweils spezifischen Inhibitoren "herauszufischen" und den Überstand, der die ungebundenen Inhibitoren enthält, mit dem nächsten Enzymharz zu behandeln.

Die Isolierung der Eglane unter Anwendung dieser eleganten, spezifischen und zeitsparenden Methode (Durchführung meistens im batch-Verfahren) scheiterte jedoch an den schlechten Ausbeuten (<25%), die für die chymotryptische Hemmaktivität ermittelt wurden.

Lange Zeit wurde nach einer Erklärung für dieses ungewöhnliche Verhalten der Eglins bei der Affinitätschromatographie gesucht, bis mit den Untersuchungen zum Hemmechanismus dieser Inhibitoren die Ursache gefunden werden konnte. Die Affinitätschromatographie an immobilisierten Enzymen basiert auf einem reversiblen Vorgang, der von den Eglins, zumindest was die Komplexbildung mit Chymotrypsin betrifft, nicht erfüllt wird. Die geringen Inhibitorausbeuten sind verursacht durch die Inaktivierung der Eglins bei der Reaktion mit dem Enzym; das aus dem Komplex freigesetzte Inhibitorderivat ist inaktiv.

E.2. Zur Charakterisierung der Eglins

Es wurden zwei Isoinhibitoren, Eglin b und Eglin c, isoliert. Die Homogenität der Präparationen wurde mittels Disk-Elektrophorese, SDS-Elektrophorese, Endgruppenbestimmung und Aminosäureanalyse nachgewiesen.

Die Charakterisierung ergab für beide Inhibitoren das gleiche Molekulargewicht und identische C- und N-Termini; sie unterscheiden sich nach der Aminosäureanalyse jedoch in einer Aminosäure: Eglin b enthält einen zusätzlichen Histidinrest, Eglin c einen zusätzlichen Tyrosinrest. Diese Heterogenität der beiden Eglins ist durch einen Ein-Basenaustausch zu erklären: die Basensequenz für Tyrosin lautet UAU oder UAC, für Histidin CAU oder CAC; es hat also ein Austausch zwischen Uracil und Cytosin stattgefunden.

Die beiden Isoinhibitoren unterscheiden sich ferner in ihren isoelektrischen Punkten (s. C.2.1.3.) und demzufolge auch in ihrer elektrophoretischen Mobilität. Ob dieser Unterschied alleine auf den Aminosäureaustausch zurückzuführen ist oder aber auch auf einen unterschiedlichen Amidierungsgrad der beiden Eglins, kann erst durch die Ermittlung der Sequenz geklärt werden.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes wurde mittels SDS-Elektrophorese durchgeführt. Als Referenzprotein wurde u.a. BPTI eingesetzt, der wie sich zeigte, eine nahezu gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die Egline aufwies. Diese Tatsache deutete darauf hin, daß die Molekulargewichte der beiden Proteine sehr ähnlich sein mußten. Die Annahme stellte sich jedoch als falsch heraus und gab den Anstoß zu einer kritischen Betrachtung der Untersuchungsmethode.

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Elektrophorese basiert auf zwei Faktoren: 1. Die SDS-Bindungskapazität von vollständig reduzierten Proteinen, entsprechend einkettigen Polypeptidsträngen, ist so hoch, daß die Eigenladung der Proteine in Relation dazu unerheblich klein wird; außerdem ist die Menge des gebundenen SDS pro Gramm Protein konstant. 2. Das Verhältnis von effektiver Ladung des SDS-Protein-Komplexes zum Reibungskoeffizienten ist konstant und unabhängig vom Molekulargewicht (111, 125). Als Konsequenz resultiert eine lineare Abhängigkeit des Molekulargewichtes einsträngiger Proteine von deren elektrophoretischer Mobilität. Die notwendigen strukturellen Voraussetzungen dafür werden von den meisten Proteinen im Molekulargewichtsbereich 15 000 - 200 000 erfüllt. Es gibt aber auch strukturelle Besonderheiten, die zu einer falschen Molekulargewichtsbestimmung führen (126,127) und bei niedermolekularen Proteinen relativ stark ins Gewicht fallen. Dazu gehört z.B. eine ausgeprägte Eigenladung von Proteinen (z.B. bei Histonen) oder eine anormale SDS-Bindung (z.B. bei Glykoproteinen). Eine verminderte SDS-Bindung tritt z.B. ein, wenn unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine vollständige Reduktion der Disulfidbrücken erzielt wurde; die Proteine sind dann nicht voll "entfaltungsfähig" (restriction of the conformational freedom, 111), die Proteinstruktur nicht langgestreckt kettenförmig. Die elektrophoretische Mobilität ist dann nicht allein vom Molekulargewicht abhängig, sondern wird beeinflusst durch die verminderte SDS-Bindung und die veränderte Konformation des Proteins, d.h. dem Reibungskoeffizienten. Unter diesen Voraussetzungen sollte die Verwendung von BPTI als Mar-

kerprotein in der SDS-Elektrophorese betrachtet werden. BPTI ist ein sehr kompaktes, stabiles, sehr basisches Molekül und nur unter drastischen Reaktionsbedingungen vollständig zu reduzieren. Die elektrophoretische Mobilität des BPTI-SDS-Komplexes ist abhängig vom Reduktionsgrad und wird beeinflusst von der stark positiven Eigenladung des Moleküls; sie ist deshalb u.U. nicht linear abhängig vom Molekulargewicht. Das heißt, Proteine mit gleicher elektrophoretischer Mobilität können durchaus ein anderes Molekulargewicht besitzen.

Die elektrophoretische Mobilität der Eglyne in der SDS-Elektrophorese ist sowohl vor als auch nach Reduktion identisch. Da außerdem der isoelektrische Punkt (s. C.2.1.3.) in der Nähe des Neutralpunktes liegt, ist mit keinem anormalen Verhalten in der SDS-Elektrophorese zu rechnen. Man kann daher annehmen, daß das Molekulargewicht der Eglyne höher ist als das des BPTI.

Als außergewöhnlichstes chemisches Merkmal der Eglyne ist das Fehlen von Cystein bzw. Cystin hervorzuheben. Es sind in der Gruppe der Serinproteinase-Inhibitoren vom Proteintyp bis heute nur noch die Hefe-Inhibitoren der Proteinase B bekannt, die sich ebenfalls durch das Fehlen von Disulfidbrücken auszeichnen (42, 43). Auf die Besonderheit dieses Strukturmerkmals wurde bereits in den Ausführungen über die molekularen Aspekte der Enzym-Inhibitor-Reaktion (s.a. S. 19) hingewiesen.

Viele strukturchemische, kinetische und physikalische Untersuchungen haben die Bedeutung der kovalenten Fixierung der Struktur der Inhibitoren durch Disulfidbrücken hinsichtlich der biologischen Aktivität der Inhibitoren gegen Proteinasen bestätigt. Es wurde daraus ursprünglich die Hypothese abgeleitet, daß der Hemmaktivität von Protein-Proteinase-Inhibitoren ein allgemeines molekulares Prinzip, der sogenannte Disulfid-loop, zu Grunde liegt (70). Eine Ausnahme bilden die Plasma-Inhibitoren.

Unser Interesse konzentrierte sich demzufolge zunächst auf die Aufklärung der Primärstruktur des Eglins und im Weiteren auf die Untersuchung des Hemmechanismus.

E.3. Zur Sequenzaufklärung

Die Sequenzstudien waren insofern von Problemen begleitet, als das Eglin in seiner nativen (hemmaktiven) Form zu den enzymatischen Spaltungsreaktionen eingesetzt werden mußte, das native Protein aber durch seine offensichtlich kompakte Struktur gegen den proteolytischen Angriff einiger Enzyme besonders resistent ist. Die folgenden Experimente sollen dafür als Beispiel angeführt werden:

1. Die Inkubation des Eglins mit Trypsin nach Blockierung der Lysinreste (in Position 8 und 15) mit Citraconsäureanhydrid verlief nahezu ohne jede Spaltung. Dagegen war die tryptische Spaltung des unmodifizierten, nativen Proteins erfolgreich. Die Arginine, die die Positionen 22,48,50 (oder 51) und 53 einnehmen, scheinen im Inneren des Moleküls verborgen zu liegen und sind erst dann durch Trypsin angreifbar, wenn die N-terminalen Lysinpeptide abgespalten sind. Dafür spricht auch die Resistenz des Eglins gegen die Proteolyse mit der arginin-spezifischen Protease aus den Submandibularisdrüsen der Maus (128).
2. Die Spaltungsversuche mit der Proteinase aus *Staphylococcus aureus* waren ebenfalls erfolglos.
3. Die C-terminale Aminosäurebestimmung mit Carboxypeptidase Y war erst nach Zusatz von Natriumdodecylsulfat zum Inkubationsansatz erfolgreich. Dieses Detergenz bewirkt offensichtlich eine Entfaltung des nativen Proteins, die mit einer Freilegung des C-Terminus verbunden ist und sodann den Angriff des Enzyms ermöglicht (s.a. C.2.1.1.).

Die Erfahrungen aus diesen proteolytischen Abbauversuchen deuten darauf hin, daß Eglin eine äußerst kompakte und resistente Struktur mit einem verborgenen C-terminalen Bereich besitzt. Da die Struktur nicht durch kovalente Bindungen von Disulfidbrücken fi-

tiert ist, müssen andere, nicht kovalente Kräfte für die Stabilität verantwortlich sein.

Aus der Aminosäurezusammensetzung der Eglins geht hervor, daß der Prozentsatz an Valin (15,7%), Leucin und Phenylalanin (je 7%) relativ hoch ist. Man kann daher annehmen, daß besonders hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilität der Eglinstruktur beitragen. Diese Hypothese ist jedoch spekulativ und wird nur über die Röntgenstrukturanalyse zu klären sein.

E.4. Zum Hemmechanismus

Ausgehend von der Aminosäurezusammensetzung bzw. der Primärstruktur des Eglins c drängte sich die Frage auf, ob die Reaktion der Eglins mit den von ihnen gehemmten Proteinasen nach dem gleichen Hemmechanismus abläuft, wie er für die natürlich vorkommenden Protein-Proteinase-Inhibitoren bekannt ist.

Inkubationsversuche mit Chymotrypsin haben die Vermutung bestätigt, daß der Hemmechanismus der Eglins in der Tat einem anderen Prinzip folgt. Um die Unterschiede der Reaktion zwischen den Eglins und den bekannten Protein-Proteinase-Inhibitoren hervorzuheben, soll an dieser Stelle nochmals auf die Reaktionsgleichung 2 der Enzym-Inhibitor-Reaktion verwiesen werden (s. S.11).

Die wichtigsten phenomologischen Charakteristika dieser Reaktion sind von Laskowski jr. (in Tabelle 14) beschrieben worden (70).

Enzym und Inhibitor reagieren zum Komplex, dem tetraedrischen Zwischenprodukt, in dem die katalytischen Funktionen des Enzyms gehemmt sind. Der Komplex ist im neutralen Medium sehr stabil, die Dissoziation sehr gering.

Das tetraedrische Zwischenprodukt kann in substratanaloger Weise zum Acylenzym unter Spaltung einer Peptidbindung im reaktiven

Tabelle 14 Phenomenological Characteristics of the Standard Mechanism
(Übernommen von M. Laskowski jr. (70))

1. Incubation of the inhibitor with catalytic quantities of the enzyme it inhibits leads to specific hydrolysis of one peptide bond--the reactive site peptide bond--in the inhibitor molecule, thus converting the inhibitor from virgin (peptide bond intact) to modified (peptide bond hydrolyzed).
2. The two fragments of modified inhibitor do not dissociate but are held together. In all cases studied thus far the fragments are held together by one or more disulfide bridges. The equilibrium constant for virgin to modified inhibitor conversion is close to unity at neutral pH.
3. Both virgin and modified inhibitors are active but modified inhibitor reacts with the enzyme it inhibits much more slowly than virgin inhibitor. The stable enzyme-inhibitor complex is the same chemical substance whether formed from virgin or from modified inhibitor.
4. Kinetically controlled dissociation of enzyme-inhibitor complex produces predominantly virgin inhibitor.
5. Removal of either the newly formed COOH terminal amino acid residue or the newly formed NH_2 terminal amino acid residue from modified inhibitor causes loss of activity. Modifications or replacements of the COOH terminal amino acid side chain frequently cause predictable changes in specificity or loss of activity. Any blockage of the NH_2 terminal amino acid residue preventing reformation of the reactive site peptide bond causes loss of activity.
6. The complex involves extremely close fit between the reactive site of the inhibitor and the active site of the enzyme. The carbonyl of the reactive site of the inhibitor is tetrahedral and forms long covalent bond with oxygen O^Y of the catalytic serine of the enzyme.
7. The conformation of the residues in the inhibitor interacting with the enzyme is closely similar in various inhibitors even though the inhibitors themselves are not conformationally similar.

Zentrum des Inhibitors weiterreagieren; es entsteht der modifizierte Inhibitor. Die Reaktion ist reversibel, nativer und modifizierter Inhibitor stehen in einem thermodynamischen Gleichgewicht zueinander (s.a. Hydrolysekonstante, S. 12).

Um den Gegensatz zu dem folgend beschriebenen Hemmechanismus der Eglise herauszustellen, sei nochmals darauf hingewiesen, daß das tetraedrische Zwischenprodukt das zentrale Reaktionsprodukt der Enzym-Inhibitor-Reaktion darstellt.

Die Interaktion der Eglise mit den von ihnen gehemmten Proteinasen verläuft zwar nach derselben Reaktionsgleichung (s.S. 11), aber in diesem Fall scheint als zentrales Reaktionsprodukt der Acylenzym-Komplex aufzutreten. Hierzu seien die Versuchsergebnisse aus den Untersuchungen zum Hemmechanismus (s. C.4.2.) herangezogen.

Eglin reagiert mit Chymotrypsin zum Enzym-Inhibitor-Komplex unter Abspaltung eines Peptids aus dem Inhibitmolekül; die Menge des abgespaltenen Peptids entspricht demnach der eingesetzten molaren Enzymkonzentration.

Die Reaktion der Eglise mit Chymotrypsin (andere Proteinasen sind noch nicht getestet) führt also ebenfalls zu einer proteolytischen Spaltung einer spezifischen Bindung im Inhibitmolekül; es entsteht der Acylenzym-Komplex. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Mechanismus ist diese Reaktion jedoch irreversibel, bedingt durch die Struktur der Eglise; die erfolgte limitierte Proteolyse führt zur Abspaltung eines Peptids (Eglinfragment 2), das entstandene modifizierte Eglin (Eglinfragment 1) ist nach Freisetzung aus dem Acylenzym-Komplex hemminaktiv.

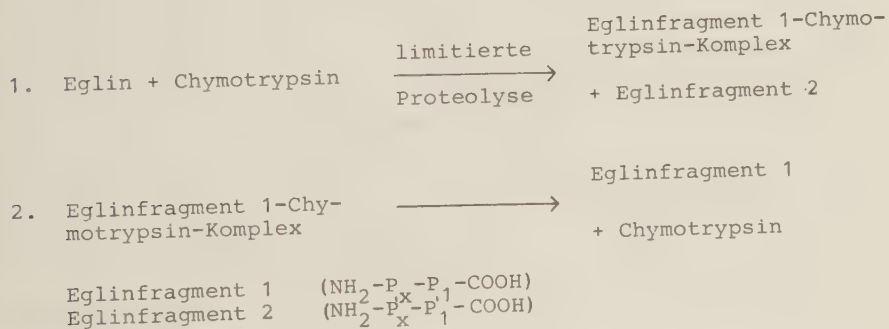
Dies ergibt sich aus der Beobachtung, daß in den Inkubationsansätzen von Eglin mit Chymotrypsin in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, dem pH und dem molaren Enzym-Inhibitor-Verhältnis eine Abnahme der Hemmaktivität festgestellt wurde. Dieser Hemmaktivitätsverlust ist darauf zurückzuführen, daß der Eglin-Chymotrypsin-Komplex zwar eine stabile Verbindung darstellt, die jedoch unter geeigneten Bedingungen dissoziiert in ein hemminaktives Eglinbruchstück und aktives Chymotrypsin. Das freigesetzte Enzym kann dann wiederum im Sinne einer limitierten Pro-

teolyse mit nativen Eglinmolekülen zum Komplex reagieren. Als Folge ist eine Abnahme der Hemmaktivität des Inkubationsansatzes zu beobachten; es findet ein "Inhibitor-turnover" statt. Die Dissoziation des Eglin-Chymotrypsin-Komplexes ist nach den vorliegenden Versuchsergebnissen pH-abhängig.

Während die Hemmaktivität in den alkalischen Inkubationsansätzen (pH 7,8) nahezu konstant bleibt (ausgenommen bei Inkubation mit 90 Mol% Enzym), ist im sauren Medium (pH 3,0) eine starke Hemmaktivitätsabnahme (verbunden mit einer Intensitätszunahme der niedermolekularen Bande in der SDS-Elektrophorese) messbar.

Der Inhibitor-turnover ist abhängig von der frei vorliegenden Enzymmenge. Bei Inkubation mit 90 Mol% Chymotrypsin ist die dissoziierte Enzymmenge im alkalischen Ansatz ebenfalls ausreichend, um einen raschen Eglinabbau herbeizuführen.

Aus den Versuchen wird folgender Hemmechanismus der Egline abgeleitet:



Dieser hypothetische Hemmechanismus bietet eine einleuchtende Interpretation der vorliegenden Ergebnisse; zur weiteren Stützung der Hypothese ist u.a. die Identifizierung des durch die limitierte Proteolyse abgespaltenen Bruchstückes (Eglinfragment 2) sowie die Identifizierung des modifizierten Eglins (Eglinfragment 1) geplant.

Der Unterschied der Egline zu den anderen Protein-Proteinase-Inhibitoren beruht also darauf, daß die Resynthese der gespaltenen Peptidbindung im reaktiven Zentrum nicht erfolgen kann. Diese Resynthese - darauf sei nochmals hingewiesen - kann nur dann erfolgen, wenn die Reaktion energetisch begünstigt ist. Dies ist der Fall, wenn die P_1 - und P_1' -Aminosäure im Inhibitormolekül durch Disulfidbrücken so starr fixiert ist, daß keine Flexibilität möglich ist.

In diesem Zusammenhang sei nochmals auf den BPTI hingewiesen, der in seiner nativen Form nur nach sehr langer Inkubationszeit durch limitierte Proteolyse in seine modifizierte Form übergeführt werden kann. Nach selektiver Reduktion der Disulfidbrücke Cys14-Cys38 kann eine beschleunigte Spaltung der Lys(15)-Ala(16)-Bindung des reaktiven Zentrums eintreten, ermöglicht durch eine erhöhte Flexibilität der beiden antiparallelen Ketten an der Molekülspitze des Inhibitors (52). Nach Reoxydation entsteht sodann der modifizierte Inhibitor BPTI°.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der selektiv reduzierte BPTI im Gegensatz sowohl zum nativen als auch zum modifizierten BPTI ein temporärer Hemmstoff ist: Während die beiden letzteren trotz Inkubation mit 80 Mol% Trypsin bei pH 7,8 oder 3,7 über mehrere Tage stabil sind, verliert das selektiv reduzierte Derivat seine gesamte Hemmaktivität schon nach 44 Stunden bei Inkubation mit 20 Mo% Trypsin bei pH 3,7. Dies ist ein Beispiel dafür, daß eine eingeschränkte Fixierung ($\rightarrow$ erhöhte Flexibilität) der Inhibitorraumstruktur die Spaltung der Peptidbindung im reaktiven Zentrum fördert (die Hydrolysekonstante K_{Hyd} steigt), die Resynthese ist energetisch erschwert und eine folgende unspezifische Proteolyse erleichtert.

Wenn man den hypothetischen Hemmechanismus der Egline als zutreffend akzeptiert (bestätigende Versuche stehen noch aus), fällt die Ähnlichkeit zu den Plasma-Inhibitoren $C\bar{I}$ -Inaktivator und α_1 -Antitrypsin ins Auge.

Der $C\bar{I}$ -Inaktivator ($C\bar{I}$ -INA), der nicht nur die Proteinasen des Komplementsystems hemmt, sondern auch die Blutgerinnung, Fibrino-

lyse und das Kallikrein-Kinin-System beeinflusst (s.a. Tabelle 1), reagiert z.B. mit Plasmin ebenfalls unter Abspaltung eines Peptids vom Inhibormolekül zum Acylenzym-Komplex. Die stöchiometrische Komplexbildung, die mit der Inaktivierung der plasminolytischen Aktivität verbunden ist, ist allerdings auch mit dem nativen Inhibitor möglich (129). Die Interaktion des C $\bar{I}$ -INA mit den Komplementfaktoren C $\bar{I}$ r und C $\bar{I}$ s verläuft dagegen ohne limitierte Proteolyse (130).

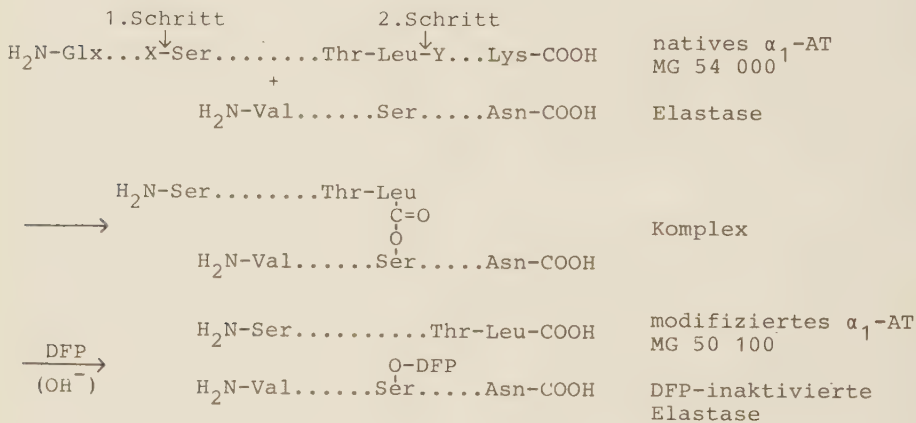
Die Ähnlichkeit der Egline mit dem α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) ist noch augenfälliger. Die Untersuchung der Reaktion dieses Plasma-Inhibitors mit Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase zeigt, daß die Interaktion mit diesen Enzymen die Abspaltung eines Peptids (MG 8 000) vom α_1 -AT zur Folge hat (131-134). Diese limitierte Proteolyse erfolgt an einer H₂N---Met-^{Thr}_{Ser}-----COOH Bindung im N-terminalen Bereich (135,136); das aus dem Komplex freigesetzte, modifizierte α_1 -AT ist hemminaktiv.

Inkubationsversuche von α_1 -AT mit Schweinepankreas-Elastase, durchgeführt von James und Cohen (138), führten zu dem Ergebnis, daß es zwei spezifische, labile Peptidbindungen im α_1 -AT gibt, eine H₂N---X-Ser-----COOH Bindung im N-terminalen Bereich und eine H₂N-----Thr-Leu-Y---COOH Bindung im C-terminalen Bereich. Die Inaktivierung der Elastase tritt nur dann ein, wenn zunächst die X-Ser Bindung unter Freisetzung eines Peptids (MG 1 200) gespalten wird. Dieser als Aktivierung interpretierbaren Reaktion schließt sich die Proteolyse der Leu-Y Bindung an; es erfolgt die Abspaltung eines C-terminalen Peptids (MG 2 700) und es bildet sich der stabile Enzym-Inhibitor-Komplex (Acylenzym-Komplex).

Findet als erster Schritt die Spaltung der Leu-Y Bindung statt, so ist eine Komplexbildung, d.h. die Inaktivierung der Elastase nicht mehr möglich.

Der α_1 -AT-Elastase-Komplex kann durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) bei alkalischem pH gespalten werden, es resultiert die Freisetzung der DFP-inaktivierten Elastase und eines modifizierten, hemminaktiven α_1 -AT-Derivates mit einem Molekulargewicht von 50 100 (MG des nativen α_1 -AT: 54 000).

James und Cohen formulierten folgenden Reaktionsmechanismus:



Dieses Reaktionsmodell zeigt Ähnlichkeiten mit Ergebnissen aus Inkubationsversuchen von Eglin c mit Chymotrypsin. Bei diesen Untersuchungen gibt es Hinweise auf die Beteiligung einer $\text{H}_2\text{N--Thr-Leu-Asn--COOH}$ Bindung im Eglin c bei der Interaktion mit dem Enzym. Eine Bestätigung dieses Resultates steht allerdings noch aus.

Die Übereinstimmung der Eglin e mit α_1 -AT, ergänzt durch die Tatsache, daß beide Inhibitoren ein nahezu identisches Hemmspektrum aufweisen, legt die Vermutung nahe, daß auch in den Sequenzen beider Proteine Homologien zu finden sind.

Ein Vergleich der Eglinsequenz mit den aufgeklärten Teilsequenzen des α_1 -AT (135-137) unterstützt diese Vermutung: Im Bereich des reaktiven Zentrums von α_1 -AT fällt eine gewisse Ähnlichkeit zur Eglinstruktur auf (Abb.29).

Sollten die Eglin e als Vorläufer des α_1 -AT auf einer niederen Entwicklungsstufe anzusehen sein?

Ähnliche Überlegungen lassen sich auch für die anderen Blutegel-Inhibitoren anstellen. So hemmt Hirudin die Gerinnungsfaktoren IXa und IIa und steht somit dem Antithrombin III des Plasmas nahe.

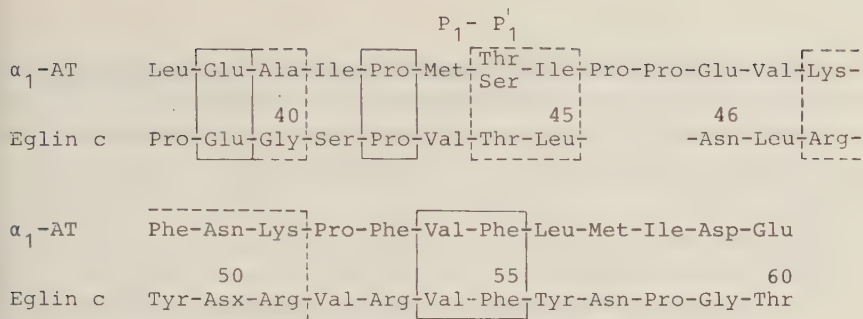


Abb.29 Vergleich der Eglinsequenz mit der Teilsequenz des α_1 -Antitrypsins im Bereich des reaktiven Zentrums
 — identische, ---- ähnliche Aminosäuren

Ein anderer Inhibitor des Blutegels weist Ähnlichkeiten mit dem Inter- α -Trypsin-Inhibitor auf. Bei der Gelfiltration des Blutegelrohextraktes an Sephadex G-75 (s. C.1.1.) wurde eine hochmolekulare Trypsin-Plasmin-Inhibitor-Fraktion (Fraktion I, MG $\sim 38\ 000$) isoliert. Mit dieser unter identischen Bedingungen rechromatographierten Fraktion wurde eine Affinitätschromatographie an Trypsin-Cellulose-Harz durchgeführt. Zu unserer Überraschung traten nach dieser Behandlung und neuerlicher Gelfiltration an Sephadex G-75 nunmehr drei Trypsin-Plasmin-Inhibitor-Fractionen mit Molekulargewichten von 38 000 (ca. 25% der Ausgangsaktivität), 17 000 und 11 000 (zusammen ca. 66% der Ausgangsaktivität) auf. Durch das katalytisch aktive Enzymharz scheint ein limitierter Abbau des hochmolekularen Inhibitors in niedermolekulare, aktive Fragmente stattgefunden zu haben. Ob es sich dabei um die Abspaltung eines inaktiven Molekülteils oder um die Spaltung in aktive Untereinheiten handelt, bleibt zu klären.

Diese Ergebnisse weisen Parallelen zu den Untersuchungen von Hochstrasser und Mitarbeitern am Inter- α -Trypsin-Inhibitor (ITI) auf. Dieser humorale, säurelabile Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 160 000 wird durch limitierte Proteolyse in den säurestabilen Serum-Trypsin-Plasmin Inhibitor mit einem Molekularge-

wicht von 34 000 (ITI 34) abgebaut (139a,b, 140). Dieses Abbau-
produkt ist sezernierbar und wird glomerulär filtriert.
Wir vermuten einen ähnlichen Zusammenhang zwischen dem hochmole-
kularen Trypsin-Plasmin-Inhibitor (Fraktion I) und den Bdel-
linen.

Die aufgezeigten Parallelitäten zwischen den Blutegelinhibitoren
und den Inhibitoren des Plasmas sind rein hypothetisch. Diese
Überlegungen bedürfen eingehender Sequenzstudien und Sequenzver-
gleiche.

E.5. Hemmcharakteristik und Homologie

Die Eglins gehören zu den stärksten, säurestabilen, natürlich
vorkommenden Inhibitoren von Chymotrypsin, Subtilisin und den
Granulozytenenzymen Elastase und Kathepsin G. Die Hemmung er-
folgt durch die Assoziation äquimolarer Proteinmengen zum in-
aktiven Enzym-Inhibitor-Komplex. Diese 1:1 Komplexbildung kann-
te sehr anschaulich durch die diskoelektrophoretische Auftrennung
von Inkubationsansätzen mit konstanten Mengen Eglins c und stei-
genden Mengen Chymotrypsin demonstriert werden: Eglins c allein
erscheint als eine diskrete Bande; durch Zugabe von Chymotrypsin
erscheint eine zweite Bande, die mit steigender Enzymmenge in
dem Maße an Intensität zunimmt, wie die Inhibitorbande abnimmt.
Die zweite Bande, die als einzige bei äquimolarer Konzentration
von Eglins c und Chymotrypsin auftritt, ist eindeutig dem Komplex
zuzuordnen.

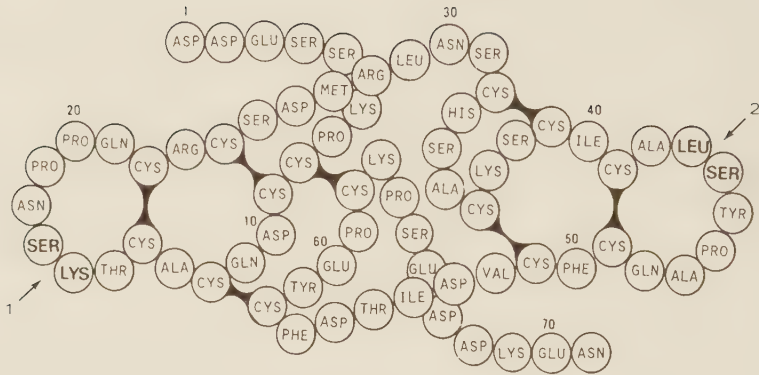
Die Hemmaktivität der Eglins gegen Trypsin und Pankreas-Elastase
ist vergleichsweise schwach. Um eine 50%ige Hemmung zu erreichen
muß ein 10-20facher molarer Überschuß an Inhibitor eingesetzt
werden (vgl. C.2.6.).

Es sind eine Reihe von Protein-Proteinase-Inhibitoren mit ähnlichem Hemmspektrum wie dem der Eglyne bekannt: Hundesubmandibularis-Inhibitor DSI (141), Truthahn- und Hühnerovomucoid (142), die Antileukoprotease HUSI-I aus Human-Seminalplasma (143) und Bronchialschleim (144), Inhibitoren aus der Familie der Leguminosen, wie der Bowman-Birk-Inhibitor aus der Sojabohne BBI (145), der Limabohnen-Inhibitor LBI (146) und der Kichererbsen-Inhibitor CPI (147).

Die genannten Inhibitoren sind bereits vollständig oder nahezu vollständig (167) sequenziert. Es zeigte sich dabei, daß LBI, BBI und CPI doppelköpfige und die Ovomucoide dreiköpfige Inhibitoren darstellen. Dieses Charakterisierungskriterium bezieht sich auf ein Strukturmerkmal, das das Auftreten mehrerer, voneinander unabhängiger Domänen beschreibt. Jede dieser Domänen enthält ein Hemmzentrum bzw. reaktives Zentrum. Als Beispiel ist die Sequenz und kovalente Struktur des Bowman-Birk-Inhibitors abgebildet (Abb.30a). Das Molekül besteht aus zwei Polypeptidhälften von nahezu gleicher Größe und Struktur, wobei der eine Teil für die Trypsinhemmung (reaktives Zentrum Lys16-Ser17), der andere für die Chymotrypsin-Elastase-Hemmung (reaktives Zentrum Leu43-Ser44) verantwortlich ist. Cyanbromidspaltung und Pepsineinwirkung ermöglichten die Spaltung des nativen Inhibitors in zwei Bruchstücke mit entsprechenden Hemmaktivitäten (Abb.30b).

Obwohl die Eglyne eine ähnliche Hemmcharakteristik wie die oben aufgeführten Inhibitoren aufweisen, konnte bislang keine strukturelle Homologie zu einem dieser Hemmstoffe gefunden werden. Da der Sequenzvergleich ohne die Orientierungshilfe der Cystinpositionen nahezu unmöglich ist, wurde die Homologiesuche an Hand des von Gibbs und McIntyre vorgeschlagenen Diagramms vorgenommen (148). Diese Methode ermöglicht auch dann identische Sequenzfolgen zu erkennen, wenn Verschiebungen, Auslassungen und Einfügungen von Aminosäuren auftreten. Nach diesem Verfahren wurde Eglylin mit Inhibitoren der verschiedenen homologen Typen verglichen.

a



b

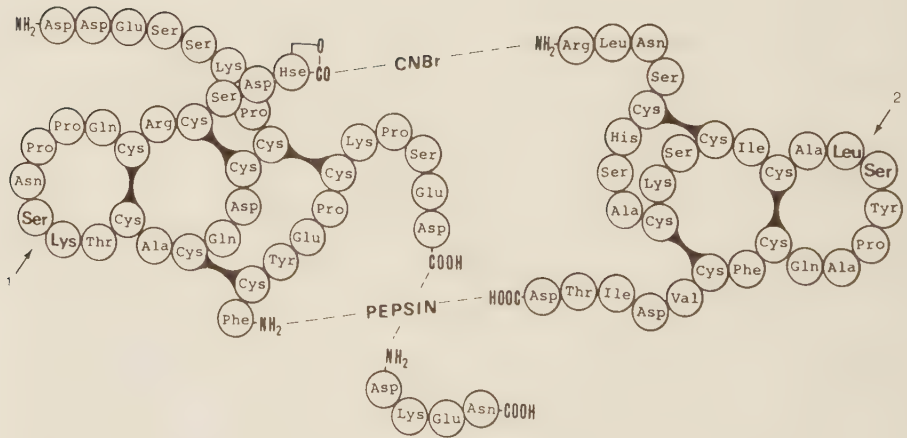


Abb.30a Struktur des Bowman-Birk-Inhibitors

- 1 reaktives Zentrum für Trypsin
- 2 reaktives Zentrum für Chymotrypsin-ähnliche Proteinasen)

Abb.30b Spaltung des Bowman-Birk-Inhibitors in zwei aktive Domänen (145)

Die einzige Homologie in einigen Sequenzbereichen konnte zum Chymotrypsin-Inhibitor I der Kartoffel gefunden werden (149, 150). Dieser Chymotrypsin-Trypsin-Inhibitor stellt ein komplexes Protein dar, das sich aus vier heterogenen Untereinheiten zusammensetzt, die sich u.a. in ihrer Aminosäurezusammensetzung und Hemmaktivität gegen Chymotrypsin und Trypsin unterscheiden. Die Sequenz der vier Untereinheiten ist bis auf wenige Aminosäureaustausche identisch. Ein Vergleich der Sequenz der Untereinheit A mit Eglin ist in Abbildung 31 dargestellt.

Die beiden Inhibitoren weisen trotz ihres so unterschiedlichen Ursprungs bemerkenswerte Ähnlichkeiten auf: 1) Der Kartoffelinhibitor besitzt mit nur einer Disulfidbrücke ebenfalls ungewöhnlich wenig Cystin. Er unterscheidet sich damit ebenso wie das Eglin von den meisten bekannten Inhibitoren und er unterscheidet sich auch von den anderen Kartoffel-Inhibitoren (151,152). 2) Der Kartoffelinhibitor weist in sich zwei homologe Sequenzbereiche auf, und zwar sind das die Positionen 47-58 und die Positionen 72-84. Die Autoren nehmen an, daß es sich dabei um zwei Inhibitor-domänen mit je einem reaktiven Zentrum handeln könnte, in Analogie zu den bekannten doppelköpfigen, in sich homologen Inhibitoren wie z.B. BBI und LBI. Interessanterweise deckt sich die Eglinsequenz größtenteils in ihrem C-terminalen Teil mit diesen homologen Bereichen.

3) Sowohl Eglin c als auch der Kartoffelinhibitor haben einen ausgeprägt positiven Ladungsbereich, der durch das dicht aufeinanderfolgende Auftreten von je drei der insgesamt vier Arginine gekennzeichnet ist. Die Sequenzen können in diesem Teil zur Dekkung gebracht werden, wenn man die Sequenz des Eglin c ab Position 47 um 14 Aminosäuren streckt.

4) In dieser Sequenzfolge von 14 Aminosäuren, die im Eglin fehlt, befindet sich der eine der beiden homologen Bereiche.

Das Auftreten von homologen Sequenzen innerhalb einer Polypeptidkette wird nicht nur in den mehrköpfigen Inhibitoren, sondern

<u>Eglin c</u>																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Thr	Glu	Phe	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Ser	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Asn	Gln	Ala
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Glu	Phe	Glu	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Trp	Pro	Glu	Leu	Ile	Gly	Val	Pro	Thr	Lys	Leu
<u>Chymotrypsin-Inhibitor aus Kartoffeln</u>																				

22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Arg	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	His	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Asn	Val	Tyr	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Lys	Glu	Ile	Ile	Glu	Lys	Gln	Asn	Ser	Leu	Ile	Ser	Asn	Val	His	Ile	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser
<u>Lys-Glu-Ile-Ile-Glu-Lys-Gln-Asn-Ser-Leu-Ile-Ser-Asn-Val-His-Ile-Leu-Leu-Asn-Gly-Ser-Pro</u>																				

43	44	45	46	47	48	49	50
Val	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr	Asx
44	45	46	47	48	49	50	51
Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Leu	Gly	Asp
<u>Val-Ile-Leu-Gly-Asp-Val-Val-Gln-Leu-Pro-Val-Val-Gly-Met-Asp-Phe-Arg-Cys-Asp</u>							

51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Arg	Val	Arg	Val	Phe	Tyr	Asn	Pro	Gly	Thr	Asn	Val	Val	Asn	His	Val	Pro	His	Val	Gly
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	
Arg	Val	Arg	Leu	Phe	Asp	Asp	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Val	Gln	Ile	Pro	Arg	Val	Ala	

Abbildung 31 Vergleich der Sequenzen von Eglin c mit dem Chymotrypsin-Inhibitor aus Kartoffeln

auch in anderen Proteinen angetroffen. Man interpretiert diese Sequenzwiederholungen als das Resultat einer Genduplikation (153).

E.6. Die Zielenzyme der Eglise, die menschlichen PMN-Granulozytenenzyme

Die Hemmwirkung der Eglise gegenüber den granulozytären Proteinasen Elastase und Kathepsin G ist von besonderem Interesse bezüglich der Pathobiochemie dieser Enzyme. Die Forschung auf diesem Gebiet hat in den letzten Jahren Zusammenhänge zwischen der Aktivität des leukozytären Enzympotentials und einigen Krankheitsbildern aufgedeckt und auf molekularer Ebene geklärt (154, 155, 156).

Elastase und Kathepsin G sind in den Granula der neutrophilen Leukozyten lokalisiert, deren Aufgabe im Gewebismetabolismus und der Phagozytose besteht; diese Granulozyten gehören zu den zellulären Systemen des Körpers, die am proteolytischen Abbau von Fremdorganismen, Antigen-Antikörper-Komplexen und Gewebsproteinen (z.B. Elastin bei den Rückbildungsprozessen nach der Geburt) beteiligt sind. Das große enzymatische Potential dieser Zellen ist an der Syntheserate dieser Enzyme zu erkennen: So produziert der Körper z.B. 1g Elastase pro Tag (157).

Die physiologischen Inhibitoren der granulozytären Proteinasen sind die Plasma-Inhibitoren α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antichymotrypsin, wobei α_2 -Makroglobulin zusätzlich für die Elimination der Proteasen verantwortlich ist (158). Neben den Plasma-Inhibitoren sind in vielen Schleimsekreten, z.B. von Bronchien (144), Nase (159), Cervix (160) und im Seminalplasma (143) Inhibitoren mit spezifischer Hemmaktivität gegen Elastase und

Kathepsin G nachgewiesen worden, die offensichtlich als lokale Antagonisten dieser Enzyme fungieren.

Die Enzymfreisetzung aus den Granula erfolgt nach Stimulation der Zellen durch Bakterien bzw. Bakterienprodukte, Immunkomplexe, Kristalle (Harnstoff) oder membranaktive Substanzen. Kann die Aktivität der freigesetzten Enzyme nicht mehr durch die natürlichen Inhibitoren kontrolliert werden (z.B. bei Inhibitormangel: α_1 -AT-Mangel), kommt es zu schweren Gewebe- und Systemschädigungen: Lungenemphysem, Glomerulonephritis, rheumatische und arthritische Krankheiten und Hämorrhagien, um nur einige Beispiele zu nennen (161a,b, 162).

Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund gewinnen Inhibitoren mit der Hemmspezifität und dem niederen Molekulargewicht der Eglin ein medizinisches Interesse. Sie bieten vielleicht die Möglichkeit bei Krankheiten, die auf die überschießende Aktivität der granulozytären Elastase und des Kathepsin G zurückzuführen sind, therapeutisch einzugreifen.

Es sind bereits in vitro Versuche und Tiermodellversuche unternommen worden (s.u.), die erste Schritte in diese Richtung darstellen.

E.7. Pharmakologische Untersuchungen

Morbus Crohn

In Zusammenarbeit mit Dr. von Bary (Chirurgische Universitätsklinik München, Großhadern) wird der Einfluß von Eglin bei Morbus Crohn untersucht. "Diese von Crohn (1932) als Krankheitseinheit definierte Dünndarmerkrankung ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung mit Epitheloidzellgranulomen, Riesenzellen, lymphozytären Infiltraten und Endothelzellproliferationen der

Lymphgefäße in der Submukosa, die die Schleimhaut sekundär mit-erfasst"(163).

In einem in vitro Testsystem ist die Hemmwirkung der Eglin auf die bei Morbus Crohn auftretende,signifikant erhöhte collagenolytische Aktivität im Colon untersucht worden. Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, daß Eglin über 50% dieser collage-nolytischen Aktivität zu hemmen vermag (164).

Die Charakterisierung dieser enzymatischen Aktivität durch Akti-vierungs- und Hemmversuche bestärkt die Vermutung, daß u.a. chy-motrypsinähnliche Proteinasen wie z.B. Kathepsin G an diesem Krankheitsbild mitverantwortlich sind.

Parallele Untersuchungen wurden auch für das Colonkarzinom durch-geführt, bei dem ebenfalls eine starke Erhöhung der collagenoly-tischen Aktivität messbar ist. Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist diese enzymatische Aktivität von Eglin jedoch nur geringfügig hemmbar. Offenischtlich sind beim Karzinom vorwiegend andere als leukozytäre Proteinasen beteiligt.

Das bisherige Ergebnis zeigt eine Hemmwirkung des Eglins gegen die collagenolytische Aktivität, wie sie bei den akuten Entzün-dungsprozessen des Morbus Crohn auftritt; Eglin ist dagegen un-wirksam gegen die collagenolytische Aktivität beim Colonkarzinom.

Endotoxinämie und septischer Schock

Auf der Wachstation der Chirurgischen Universitätsklinik, Mün-chen, wurde eine klinische Studie an Sepsis-Patienten durchge-führt (165). Dieses Krankheitsbild ist unter anderem gekennzeich-net durch eine akute Gerinnungsstörung, die sowohl auf eine spe-zifische Aktivierung der Gerinnungsfaktoren (mit nachfolgender Elimination) als auch auf einen unspezifischen Abbau der Gerin-nungsfaktoren zurückzuführen ist. Es resultiert eine sog. Ver-brauchskoagulopathie.

In Zusammenhang mit dieser klinischen Studie wurde ein Endotoxin-ämiemodell am Hund entwickelt (165). Unter Endotoxininfusion kommt es zu einem signifikanten Abfall der Leukozyten, danach

zu einem starken Anstieg über die normale Zahl hinaus, gefolgt von Degranulation und Freisetzung der leukozytären Proteinase, die zur unspezifischen Proteolyse, d.h. dem Abbau von Gerinnungsfaktoren zu biologisch inaktiven Bruchstücken führt.

Die proteolytische Aktivität aus den Leukozyten ist hauptsächlich den Enzymen Elastase und Kathepsin G zuzuschreiben, die in in vitro Systemen durch entsprechende Inhibitoren hemmbar sind. Zu der Gruppe der Leukozytenproteinase-Inhibitoren gehört der Bowman-Birk-Inhibitor (143) aus Sojabohnen. Dieser Hemmstoff wurde in dem oben beschriebenen Endotoxinämiemodell eingesetzt, um die durch Elastase und Kathepsin G verursachten Abbauprozesse zu unterbinden. Es wurden folgende Parameter bestimmt: Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Antithrombin III- und Prothrombinkonzentration, Antiplasmin- und Plasminogenkonzentration, Faktor XIII-Konzentration, Komplementfaktor C3-Konzentration.

Das Ergebnis zeigt einen eindeutig reduzierten Abbau aller getesteten Faktoren unter der Inhibitorthherapie.

Da auch das Eglin zu den potenten Leukozytenproteinase-Inhibitoren gehört, ist der Einsatz von Eglin in diesem Modell geplant. Das Ziel dieser Studie besteht darin, die Verwendung von Leukozytenproteinase-Inhibitoren in der Therapie des septischen Schocks zu untersuchen. Man hofft mit diesen Inhibitoren die unspezifische Proteolyse der Gerinnungsfaktoren zu hemmen und somit einer Verbrauchskoagulopathie entgegenwirken zu können.

A U S B L I C K

Nach den z.Zt.laufenden Untersuchungen zur Vollendung der Sequenz des Eglins wird die Aufklärung der Kristallstruktur durch Röntgenstrukturanalyse angestrebt. Wir konnten Herrn Prof. Huber vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für eine Zusammenarbeit gewinnen.

Wir versprechen uns davon, die aufgeworfenen Fragen über die stabilisierenden Kräfte im Eglinmolekül, die Struktur des Komplexes mit Serinproteinasen (insbesondere Chymotrypsin) beantworten zu können und bestätigende Hinweise für den aufgezeigten Hemmechanismus zu erhalten.

Weitere Untersuchungen zur Identifizierung des modifizierten Eglins, des bei der Reaktion mit Proteinasen abgespaltenen Bruchstückes und des reaktiven Zentrums sind geplant.

Die Inkubationsversuche zur Aufklärung des Hemmechanismus sollen auch für Subtilisin und die granulozytären Proteinasen Elastase und Kathepsin G durchgeführt werden.

Eglin ist auf Grund seiner (cystinfreien) Struktur als Modellsubstanz für Proteinsynthesen prädestiniert. Die Synthese ausgeprägter Sequenzfolgen (z.B. -Leu-Arg-(Tyr-Asx-Arg,Val-Arg)-Val-), die Synthese des reaktiven Zentrums, sowie definierte Variationen der nativen Sequenzfolge eröffnen die Möglichkeit, Aussagen über die an der Enzym-Eglin-Interaktion beteiligten Strukturen zu machen.

Eglin ist nicht nur hinsichtlich seiner chemischen Struktur ein interessantes Studienobjekt, sondern bietet auf Grund seiner biologischen Wirkung viele Ansätze für pharmakologische Unter-

suchungen. Diese Untersuchungen haben zum Ziel, den Einfluß des Eglins auf die pathobiochemische Wirkung der leukozytären Proteinasen und daraus folgend Möglichkeiten für den therapeutischen Einsatz zu prüfen (s.a. E.6.).

Zum Abschluß soll die Frage nach der Funktion und physiologischen Bedeutung des Eglins bzw. der Blutegelinhibitoren gestellt werden. Die Funktion des Hirudins, des spezifischen Thrombin-Inhibitors, wird in seiner blutgerinnungshemmenden Wirkung gesehen. Die Blutaufnahme, die teilweise bis zu 5 ml betragen kann, wird für den Blutegel erleichtert und nicht durch Gerinnselbildung blockiert. Zudem würde die ohne Hirudin einsetzende Blutgerinnung zu völliger Unbeweglichkeit des Egels nach der Nahrungsaufnahme führen.

Die Funktion der Bdelline, der Trypsin-Plasmin-Inhibitoren, ist unklar; die Bedeutung von Bdelin B₃, das zusätzlich eine starke Hemmaktivität gegen Akrosin, ein beim Befruchtungsvorgang beteiligtes Enzym, besitzt, wird im Zusammenhang mit der Zwitternatur des Blutegels diskutiert.

Die Funktion der Eglins ist völlig offen. Ob ihr Auftreten in Zusammenhang mit der Blutaufnahme zu sehen ist oder ob diesen Inhibitoren andere physiologische Aufgaben zukommen, kann eventuell teilweise beantwortet werden, wenn ihre Lokalisation bekannt ist. Die Lokalisation wird in Zusammenarbeit mit Dr. Dietl bearbeitet. Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß die drei Inhibitorgruppen des Blutegels (Hirudin, Bdelline, Eglins) immunologisch differenzierbar sind: es gibt keine Kreuzreaktion zwischen den Eglins, den Bdelninen und dem Hirudin. Es gibt allerdings eine Kreuzreaktion zwischen Bdelin A und Bdelin B.

Es wird nun versucht, über die spezifische Immunreaktion entweder auf dem Wege der Immunfluoreszenz oder des Radioimmunoassays Aussagen über Bildungs- und Wirkungsort der einzelnen Inhibitorgruppen zu machen.

ERGÄNZUNG

Während diese Dissertation in die vorliegende Form gebracht wurde, führten die geplanten Experimente zur Aufklärung des hypothetischen Hemmechanismus der Egline und zur Aufklärung der Primärstruktur von Eglin c zum Erfolg.

Die Inkubation von Eglin c mit 50 Mol% Chymotrypsin bei pH 7,8 und anschließender gelchromatographischer Auftrennung führte im wesentlichen zur Hydrolyse einer Peptidbindung im Inhibitormolekül. Die zwei resultierenden Peptide, die in derselben molaren Konzentration gefunden wurden, wie die zur Inkubation eingesetzte Chymotrypsinmenge, sind identisch mit den Positionen 1-45 und 46-70 des Eglin c. Als Spaltstelle wurde die **Leu-Asp** Bindung in Position 45-46 identifiziert, die offensichtlich das reaktive Zentrum für Chymotrypsin darstellt.

Dieser präparative enzymatische Modifizierungsversuch, der analog dem in C.4.2. beschriebenen Experiment durchgeführt wurde, unterstützt die Hypothese über den aufgezeigten Hemmechanismus der Egline (s.S. 97).

Das C-terminale Peptid 46-70 erwies sich für die Sequenzaufklärung insofern als wertvoll, als es die noch fraglichen Positionen 48-53 überlappt. Die Sequenzierung führte zu folgendem Ergebnis:

46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
-Asp	-Leu	-Arg	-Tyr	-Asn	-Arg	-Val	-Arg	-Val	-Phe	-Tyr	-Asn	-Pro	-Gly	-Thr	-Asn
62	63	64	65	66	67	68	69	70							
Val	-Val	-Asn	-His	-Val	-Pro	-His	-Val	-Gly	-COOH						

Die Anordnung der Peptide T₆ und T₇ entspricht damit der Folge in Abbildung 27.

Literaturverzeichnis

- 1 R. Vogel, I. Trautschold, E. Werle (1968) in: "Natural Proteinase Inhibitors", Academic Press, New York, London.
- 2 H. Fritz, H. Tschesche (Eds.,1971) in: "Proceedings of the 1st International Research Conference on Proteinase Inhibitors", Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- 3 H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit (Eds., 1974) in: "Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd International Research Conference", Bayer Symposium V, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 4 H. Peeters (Ed.,1976) in: "Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 23th Colloquium", Pergamon Press, Oxford, New York.
- 5 H. Tschesche (1974) in: Angew.Chem.86, 21.
- 6 L. Lorand (Ed.,1976) in: Methods in Enzymology 45, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- 7 H. Holzer (1975) in: Adv.Enzyme Regulation 13, 125.
- 8 H. Umezawa (1972) in: "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin", University Park Press, Baltimore, London, Tokyo.
- 9 S. Sato, S. Murao (1973) in: Agr.Biol.Chem.37, 1067.
- 10 T. Ikenaka in l.c. 3, pp.305.
- 11 B. Kassell (1970) in: Methods in Enzymology 19, 839.
- 12 G. Wunderer, L. Beress, W. Machleidt, H. Fritz (1976) in: Methods in Enzymology 45, 881.
- 13 T. Dietl, H. Tschesche in l.c. 3,pp.254.

- 14 R.J. Peanasky, G.M. Abu-Ereish, C.R. Gaush, G.A. Homandberg, O. O Herron, R-K. Linkenheil, U. Kucich, D.R. Rabin in l.c. 3, pp.649.
- 15 F. Markwardt in l.c. 11, pp.924.
- 16 H. Fritz, M. Gebhardt, R. Meister, E. Fink in l.c.2, pp.271.
- 17 D. Bagdy, E. Barabas, L. Graf, T.E. Petersen, S. Magnusson in l.c. 6, pp.669.
- 18 R.E. Feeney, R.G. Allison (1969) in:"Evolutionary Biochemistry of Proteins",Wiley, New York.
- 19 R.E. Feeney in l.c. 2, pp.189.
- 20 M. Laskowski, jr., R.W. Sealock (1971) in: The Enzymes Vol.III 3rd Ed. (Ed. P.D. Boyer), pp.375, Academic Press, New York, London.
- 21 L. Gorini, L. Audrain (1952) in:Biochim.Biophys.Acta 8, 702.
- 22 M. Laskowski, sr., F.C. Wu (1953) in: J.Biol.Chem.204, 797.
- 23 C.B. Laurell, J.O. Jeppsson (1975) in: The Plasma Proteins Vol.I (Ed. F.W. Putnam), Academic Press, New York, San Francisco, London.
- 24 N. Heimbürger in l.c. 3, pp.14.
- 25 J.S. Brush, H. Tschesche in l.c. 3, pp.581.
- 26 C.A. Ryan (1974) in: J.Biol.Chem. 249, 5495.
- 27 G.M. Hass, H. Nan, K. Biemann, D.T. Grahm, L.H. Ericsson, H. Neurath (1975) in: Biochemistry 14, 1334.
- 28 H. Mattern, M. Hoffmann, H. Holzer (1974) in: Proc.Natl.Acad. Sci. USA 71, 4874.
- 29 Y. Shain, A.M. Mayer (1965) in: Physiol.Plant.18, 853.
- 30 V. Mansfeld, A.Ziegelhöffner, Z. Horakova, J. Hladovec (1959) in: Naturwiss.46, 172.

- 31 E.W. Davie, K. Fujikawa, K. Kurachi, W. Krisiel (1979) in: Adv.Enzymol.48, 277.
- 32 J.F. Davidson, R.M. Rowman, M.M. Samama, P.C. Desnoyers (1978) in: Prog.Chem.Fibrinolysis and Thrombolysis 3, Raven Press.
- 33 H.J. Müller-Eberhard (1975) in: Ann.Rev.Biochem.44, 697.
- 34 E. Habermann, A. Janoff (1978) in: "Neutral Proteases of Human PMN-Leucocytes, Biochemistry, Physiology and Clinical Significance", Urban und Schwarzenberg, Baltimore, Munich.
- 35 E.S.E. Hafez (1976) in: "Human Semen and Fertility Regulation in Men", The C.V. Mosby Company, St. Louis.
- 36 R.B.L. Gwatkin (1977) in: "Fertilization - Mechanism in Man and Mammals", Plenum Press, New York, London.
- 37 J.J. Pisano (1975) in: "Proteases and Biological Control"(Eds. E. Reich, D.B. Rifkin, E. Shaw), Cold Spring Harbor Laboratory.
- 38 L.J. Greene, M. Rigbi, D.S. Fackre (1966) in: J.Biol.Chem.241, 5610.
- 39 H. Fritz, I. Müller, M. Wiedemann, E. Werle (1967) in: Z. Physiol.Chem.348, 405.
- 40 H. Holzer, T. Saheki (1976) in: Tokai J.Exp.Clin.Red., Vol.I, Nr.2, 115.
- 41 I. Schechter, A. Berger (1967) in: Biochem.Biophys.Res.Commun. 27, 157.
- 42 H. Betz, H. Hinze, H. Holzer (1974) in: J.Biol.Chem.249, 4515.
- 43 K. Maier (1977) in: Dissertation an der Universität Freiburg, Fakultät für Biologie.
- 44 K. Ozawa, M. Laskowski, jr. (1966) in: J.Biol.Chem.241, 3955.
- 45 R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann in l.c. 2, pp. 56.

- 46 R.M. Sweet, H.T. Wright, J. Janin, C.H. Chothia, D.M. Blow (1974) in: Biochemistry 13, 4212.
- 47 M. Laskowski, jr., W.R. Finkenstadt, J.A. Mattis, R.E. McKee in l.c. 4, pp. 85.
- 48 U. Quast, J. Engel, G. Mair, H. Tschesche in l.c. 4, pp. 57.
- 49 J. Krahn, F.C. Stevens (1970) in. Biochemistry 9, 2646.
- 50 H. Tschesche (1967) in: Z.Physiol.Chem. 348, 1216.
- 51 M. Rigbi, L.J. Greene (1968) in: J.Biol.Chem.243, 5457.
- 52 H. Jering, H. Tschesche (1976) in: Eur.J.Biochem.61, 443.
- 53 H. Tschesche, S. Kupfer (1976) in: Z.Physiol.Chem.357, 769.
- 54 R.W. Sealock, M. Laskowski, jr. (1969) in: Biochemistry 8, 3703.
- 55 D. Kowalski, T.R. Leary, R.E. McKee, R.W. Sealock, D. Mang, M. Laskowski, jr. in l.c. 3, pp. 311.
- 56 H. Jering, H. Tschesche (1976) in: Eur.J.Biochem.61, 453.
- 57 W.R. Finkenstadt, M. Laskowski, jr. (1967) in: J.Biol.Chem.242, 771.
- 58 V. Frattelli, R.F. Steiner (1969) in: Biochem.Biophys.Res. Commun.34, 480.
- 59 R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W. Steigemann (1974) in: J.Mo..Biol.89, 73.
- 60 J. Janin, C. Chothia (1976) in: J.Mo..Biol.100, 197.
- 61 C. Chothia, J. Janin (1975) in: Nature 256, 705.
- 62 W. Bode, P. Schwager, R. Huber (1976) in: "Proteolysis and Physiological Regulation", pp.26, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- 63 R. Huber, W. Bode (1978) in: Acc.Chem.Res.11, 114.
- 64 M. Lazdunski, J.-P. Vincent, H. Schweitz, M. Peron-Renner, J. Pudles in l.c. 2, pp.420.

- 65 J.-P. Vincent, M. Peron-Renner, J. Pudles, M. Lazdunski (1974) in: *Biochemistry* 13, 4205.
- 66 H. Ako, R.J. Foster, C.A. Ryan (1974) in: *Biochemistry* 13, 132.
- 67 R. Huber, W. Bode, U. Kohl. C.A. Ryan (1975) in: *Biophys. Struct.Mech.* 1, 189.
- 68 G. Feinstein, R.E. Feeney (1966) in: *J.Biol.Chem.* 241, 5183.
- 69 R.E. Feeney, C.A. Ryan (1975) in: *J.Biol.Chem.* 250, 843.
- 70 M. Laskowski, jr., I. Kato, W.J. Kohr (1978) in: "Versatility of Proteins" (Ed. C.H. Li), Academic Press, San Francisco, London.
- 71 F. Markwardt (1957) in: *Z.Physiol.Chem.* 308, 147.
- 72 F. Markwardt (1956) in: *Arch.Exp.Path.Pharmakol.* 229, 389.
- 73 F. Markwardt, P. Walsmann (1958) in: *Z.Physiol.Chem.* 312, 85.
- 74 T.E. Petersen, H.R. Roberts, L. Sottrup-Jensen, S. Magnusson in *l.c.* 4, pp. 145.
- 75 I.P. Boskova, D.N. Cherkesova, V.V. Mosolov (1976) in: *Bio-khimiya* 41, 939.
- 76 E.W. Davie (1979) in: Vortrag auf dem 30. Moosbacher Kolloquium "Biologische Funktion von Proteinasen", 26.-28.4.79.
- 77 K. Krejci, H. Fritz (1976) in: *FEBS Lett.* 64, 152.
- 78 C. Gros, B. Labouesse (1969) in: *Eur.J.Biochem.* 7, 463.
- 79 B. Martin, I. Svendsen, M. Ottesen (1977) in: *Carlsberg Res. Commun.* 42, 99.
- 80 T. Hata, R. Hayashi, E. Doi (1967) in: *Agr.Biol.Chem.* 31, 357.
- 81 R. Hayashi, S. Moore, W.H. Stein (1973) in: *J.Biol.Chem.* 218, 2296.
- 82 R.W. Kuhn, K.A. Walsh, H. Neurath (1974) in: *Biochemistry* 13, 3871.
- 83 C.H.W. Hirs (1967) in: *Meth.Enzymol.* 11, 197.

- 84 M.A. Crestfield, S. Moore, W.H. Stein (1963) in: J.Biol.Chem. 238, 622.
- 85 N.M. Green, E. Work (1952) in: Biochem.J. 54, 347.
- 86 P. Edman, G. Begg (1967) in: Eur.J.Biochem. 1, 80.
- 87 R.N. Perham (1975) in: "Instrumentation in amino acid sequence analysis", Academic Press, London, New York San Francisco.
- 88 G. Gross, B. Wittrop (1961) in: J.Am.Chem.Soc. 83, 1510.
- 89 A. Fontana, C. Vita, C. Toniolo (1973) in: FEBS Lett. 32, 139.
- 90 H.B.F. Dixon, R.N. Perham (1968) in: Biochem.J. 109, 312.
- 91 S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle (1972) in: Science 178, 871.
- 92 S. Udenfriend in l.c. 70, pp.23.
- 93 G.E. Tarr, J.F. Beecher, M. Bell, T.J. McKean (1978) in: Anal.Biochem. 84, 622.
- 94 G. Schöllmann, E. Shaw (1963) in: Biochemistry 2, 252.
- 95 V. Kostka, F.H. Carpenter (1964) in: J.Biol.Chem. 239, 1799.
- 96 G.R. Drapeau (1976) in: Meth.Enzymol. 45, 469.
- 97 J. Hourmard, G.R. Drapeau (1972) in: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 3596.
- 98 F.M. Richards, P. J. Vithayathil (1959) in: J.Biol.Chem. 234, 1459.
- 99 K. Titani, A. Koide, J. Hermann, L.H. Ericsson, S. Kumar, R.W. Wade, K.A. Walsh, H. Neurath, E.H. Fischer (1977) in: Proc.Nat. Acad.Sci.USA 74, 4762.
- 100 O. Raiband, M.E. Goldberg (1973) in: Biochemistry 12, 5154.
- 101 K. Ohlsson, I. Olsson (1974) in: Eur.J.Biochem. 42, 519.
- 102 I. Olsson, P. Venge (1974) in: Blood 44, 235.
- 103 H. Odeberg, I. Olsson, P. Venge (1975) in: Lab.Invest. 32, 86.

- 104 H. Heber, R. Geiger, N. Heimbürger (1978) in: Z.Physiol.Chem. 359, 659.
- 105 H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle (1974) in: "Methoden der enzymatischen Analyse" (Ed.H.U. Bergmeyer), 3. Auflage, pp.1105, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- 106 S.H. Kang, M.S. Fuchs (1973) in: Anal.Biochem. 54, 262.
- 107 J. Bieth, B. Spiess, C.G. Wermuth (1974) in: Biochem.Med. 11, 350.
- 108 M.U.B. Blombäck, P. Olsson, L. Svendsen (1974) in: Thromb.Res. 5, 621.
- 109 K. Weber, M. Pringle, M. Osborn (1970) in: Meth.Enzymol. 26, 3.
- 110 H.R. Maurer in: Disc Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin, 1971.
- 111 K. Weber, M. Osborn (1975) in: The Proteins (Eds. H. Neurath, R.L. Hill) Vol.I, 179.
- 112 C. Karlsson, H. Davies, J. Öhman, U.-B. Andersson in: LKB application note 75, March 29, 1973.
- 113 D.H. Spackman, W.H. Moore (1958) in: Anal.Chem. 30, 1190.
- 114 C.H.W. Hirs (1967) in: Meth.Enzymol. 11, 197.
- 115 H. Edelhoch (1967) in: Biochemistry 6, 1948.
- 116 T. Chase, E. Shaw (1969) in: Biochemistry 8, 2212.
- 117 J.H. Heidema, E.T. Kaiser (1968) in: J.Am.Chem.Soc. 90, 1860.
- 118 O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951) in: J.Biol.Chem. 193, 265.
- 119 W.F. Brandt, P. Edman, A. Henschen, C. von Holt (1976) in: Z.Physiol.Chem. 357, 1505.
- 120 K.B. Kulbe (1974) in: Anal.Biochem. 59, 564.
- 121 J.J. Pisano, T.J. Bronzert (1969) in: J.Biol.Chem. 244, 5597.

- 122 O. Smithies, D. Gibson, E.M. Fanning, R.M. Goodfliesh, J.C. Gilman, D.L. Ballant (1971) in: Biochem.10, 4912.
- 123 J. Turkova (1978) in: "Affinity Chromatography", Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam, Oxford, New York.
- 124 H. Fritz, H. Schult, M. Neudecker, E. Werle (1966) in: Angew.Chem.78, 775.
- 125 B.M. Neville (1971) in: J.Biol.Chem.246, 6328.
- 126 R. Pitt-Rivers, F.S.A. Impiombato (1968) in: Biochem.J. 109, 825.
- 127 J.A. Reynolds, C. Tanford (1970) in: J.Biol.Chem.245, 5161.
- 128 I. Schenkein, M. Levy, E.C. Franklin, B. Frangione (1977) in: Arch.Biochem.Biophys.182, 64.
- 129 K. Nagaki, C. Hashimoto, S. Inai (1976) in: Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.50, 1.
- 130 P.C. Harpel, N.R. Cooper (1975) in: J.Clin.Invest.55, 593.
- 131 D.A. Johnson, J. Travis (1976) in: Biochem.Biophys.Res. Commun.72, 33.
- 132 K. Oda, M. Laskowski, Sr., L.F. Kress, D. Kowalski (1977) in: Biochem.Biophys.Res.Commun.76, 1062.
- 133 J.S. Baumstark, C. Ting Lee, R.J. Luby (1977) in: Biochim. Biophys.Acta 482, 400.
- 134 J.W. Bloom, M.J. Hunter (1978) in: J.Biol.Chem.253, 547.
- 135 D. Johnson, J. Travis (1978) in: J.Biol.Chem.253, 7142.
- 136 D. Johnson, J. Travis (1979) in: J.Biol.Chem.254, 4022.
- 137 D. Shochat, S. Staples, K. Hargrove, J.S. Kozel, S.K. Chan (1978) in: J.Biol.Chem.253, 5630.
- 138 H.L. James, A.B. Cohen (1978) in: J.Clin.Invest.62, 1344.
- 139a K. Hochstrasser, J. Niebel, H. Feuth, K. Lempart (1977) in: Klin.Wschr.55, 337.

- 139b K. Hochstrasser, J. Niebel, K. Lempart (1977) in: Klin.Wschr. 55, 343.
- 140 E. Wachter, K. Hochstrasser (1979) in: Z.Physiol.Chem.360, 1305.
- 141 K. Hochstrasser, G. Bretzel, E. Wachter, S. Heindl (1975) in: Z.Physiol.Chem.356, 1865.
- 142 J. Kato, W.J. Kohr, M. Laskowski, Jr. in: "Regulatory proteolytic enzymes and their inhibitors (Eds. S. Magnusson, N. Ottesen, B. Foltmann, K. Dano, H. Neurath), Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- 143 H. Schiessler, M. Arnhold, H. Fritz in l.c. 3, pp.147.
- 144 K. Ohlsson, H. Tegner, U. Akesson (1977) in: Z.Physiol.Chem. 358, 583.
- 145 T. Ikenaka, S. Odani, T. Koide in l.c. 3, pp.325.
- 146 F.C. Stevens, S. Wuerz, J. Krahn in l.c.3, pp.344.
- 147 Y. Birk in l.c.3, pp.355.
- 148 A.J. Gibbs, G.A. McIntyre (1970) in: Eur.J.Biochem.16, 1.
- 149 J.C. Melville, C.A. Ryan (1972) in: J.Biol.Chem.247, 3445.
- 150 M. Richardson (1974) in: Biochem.J.137, 101.
- 151 K. Hochstrasser, E. Werle, R. Siegelmann, S. Schwarz (1969) in: Z.Physiol.Chem.350, 897.
- 152 K. Kaiser, H.D. Belitz (1972) in: Chem.Microbiol.Technol. Lebensm.1, 191.
- 153 M. Laskowski, Jr., J. Kato, T.R. Leary, J. Schrode, R.W. Sealock in l.c.3, pp.597.
- 154 C. Mittman (1972) in: "Pulmonary emphysema and proteolysis", Academic Press.
- 155 A. Janoff, J. Blondin, R.A. Sandhaus, A. Mosser, C. Malemud (1975) in: "Proteases and biological control"(Eds. E. Reich, D.B.Rifkin, E. Shaw), Cold Spring Harbor Lab.

- 156 S. Honig, S. Hoffstein, G. Weissmann (1978) in: "Pathobiology Annual" Vol.8 (Ed. H.L. Joachim), Raven Press, New York.
- 157 C.-B. Laurell (1975) in: "Protides of the biological fluids", 22nd Colloquium, Vol.22 (Ed. H. Peeters) pp.3, Pergamon Press, Oxford.
- 158 G. Balldin, C.-B. Laurell, K. Ohlsson (1978) in: Z.Physiol. Chem.359, 699.
- 159 K. Hochstrasser, R. Reichert, M. Matzner, E. Werle, S. Schwarz (1972) in: Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.10, 104.
- 160 O. Wallner, H. Fritz (1974) in: Z.Physiol.Chem. 355, 709.
- 161a J.O. Morse (1978) in: The New England J.Med.299, 1045.
- 161b J.O. Morse (1978) in: The New England J.Med.299, 1099.
- 162 J. Lieberman (1976) in: Chest 70, 62.
- 163 W. Siegenthaler (1975) in: "Klinische Pathophysiologie", 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp.411.
- 164 S. von Bary (1979) in: Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität München.
- 165 J. Witte in (1979) in: Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität München.
- 166 H. Schiessler, persönliche Mitteilung.
- 167 S. Kupfer, E. Wachter, persönliche Mitteilung (HUSI-I).
- 168 J.A. Mattis, M. Laskowski, jr. (1973) in: Biochemistry 12, 2239.
- 169 D. Collen, B. Wiman, M. Verstraete (1979) in "The Physiological Inhibitors of Blood Coagulation and Fibrinolysis", Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- 170 R.M. Stroud, M. Krieger, R.E. Krepps II, A.A. Kossiakoff, J.L. Chambers in l.c. 155, pp.13.

LEBENS LAUF

- 22.8.1947 geboren in Bremen als zweites Kind von Friedrich Seemüller und Annemarie Seemüller, geb.Hövelmann
- 1954-1958 Besuch der Volksschule Am Alten Postweg in Bremen
- 1958-1966 Besuch des Gymnasiums an der Hamburger Straße in Bremen
- 24.11.1966 Reifeprüfung
- 1966-1968 Praktikum für Apotheker in der Kosmos-Apotheke in Bremen
- 20.9.1968 Pharmazeutische Vorprüfung
- 1969-1972 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
- 20.10.1972 Pharmazeutische Prüfung
- 29.11.1972 Approbation als Apotheker
- 1973-1975 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München
- 18.2.1975 Hauptprüfung, Teil A für Lebensmittelchemiker
- 1976-1979 Durchführung der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof.Dr. H. Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München
- ab 1.7.1979 Beginn des Praktikums für Lebensmittelchemiker, Ausbildungsabschnitt Teil B

